

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2005

VOLUMEN LXXII

Núm. 2

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

Purinergic signalling: therapeutic potential*

GEOFFREY BURNSTOCK

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia*

ABSTRACT

The concept of a purinergic signalling system, using purine nucleotides and nucleosides as extracellular messengers, was first proposed over 30 years ago. After a brief introduction and update of purinoceptor subtypes, this article focuses on the diverse pathophysiological roles of ATP, ADP, UTP and adenosine. These molecules mediate short-term (acute) signalling functions in neurotransmission, secretion and vasodilatation and long-term (chronic) signalling functions in development, regeneration, proliferation and cell death. Plasticity of purinoceptor expression in pathological conditions is frequently observed, including an increase in the purinergic component of parasympathetic nervous control of the human bladder in interstitial cystitis and outflow obstruction, and in sympathetic cotransmitter control of blood vessels in hypertensive rats. The antithrombotic action of clopidogrel, a P2Y₁₂ receptor antagonist, has been shown to be particularly useful in the prevention of recurrent strokes and heart attacks in recent clinical trials. The role of P2X₃ receptors in nociception and a novel hypothesis about purinergic mechano-sensory transduction in visceral pain will be considered, as well as the therapeutic potential of purinergic agonists or antagonists for the treatment of supraventricular tachycardia, cancer, dry eye, bladder hyperactivity, erectile dysfunction, osteoporosis, diabetes, gut motility, respiratory and vascular disorders.

Key words: Purinoceptors.—Interstitial cystitis.—Thrombosis.—Visceral pain.—Cancer.—Osteoporosis.—Peripheral vascular disease.—Cystic fibrosis.—Parkinson's disease.—Kidney failure.

* Discurso de Toma de Posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia pronunciado el día 2 de diciembre de 2004.

RESUMEN

El concepto de un sistema de señalización purinérgica, empleando los nucleótidos y nucleósidos de purina como mensajeros extracelulares, fue propuesto hace unos 30 años. Después de una breve introducción y puesta al día de los subtipos de receptores purinérgicos, este artículo se centra en los aspectos fisiopatológicos desempeñados por el ATP, ADP, UTP y adenosina. Estas moléculas median respuestas a corto plazo (agudas), como en la neurotransmisión, secreción y vasodilatación, y también respuestas a largo plazo (crónicas), como la señalización en el desarrollo, regeneración, proliferación y muerte celular. En condiciones patológicas, se observa que la expresión de los purinoceptores es muy versátil, incluyendo un incremento en el componente purinérgico del control nervioso parasimpático de la vejiga humana en el caso de sufrir cistitis intersticial y obstrucción del flujo, y también como co-transmisor en el control simpático de los vasos sanguíneos en ratas hipertensas. La acción antitrombótica del clopidogrel, un antagonista del receptor P2Y₁₂, ha demostrado ser particularmente útil en la prevención de los infartos cerebrales recurrentes e infartos cardíacos en recientes ensayos clínicos. El papel del receptor P2X₃ en la nocicepción y una nueva hipótesis sobre la transducción mecano-sensible en el dolor visceral, serán consideradas, así como el potencial terapéutico de los agonistas y antagonistas purinérgicos para el tratamiento de la taquicardia supraventricular, cáncer, ojo seco, hiperactividad de vejiga, disfunción eréctil, osteoporosis, diabetes, motilidad intestinal y anomalías respiratorias y vasculares.

Palabras clave: Purinoceptores.—Cistitis intersticial.—Trombosis.—Dolor visceral.—Cáncer.—Osteoporosis.—Enfermedad periférica vascular.—Fibrosis cística.—Enfermedad de Parkinson.—Fallo renal.

INTRODUCTION

A seminal paper by Drury and Szent-Györgi in 1929, described the potent actions of purine nucleotides and nucleosides, ATP and adenosine, on the heart and blood vessels. Then, in 1970, Burnstock and his colleagues found evidence for ATP as a neurotransmitter in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) nerves supplying the gut and in 1972 the word «purinergic» was coined and the purinergic neurotransmission hypothesis proposed by Burnstock in 1972. This concept met with considerable resistance for many years, because ATP had been established as an intracellular energy source involved in various metabolic cycles and it was thought that such a ubiquitous molecule was unlikely to be involved in selective extracellular signalling. However, the concept is now widely accepted. Later, it

was established that ATP was a cotransmitter with classical transmitters in both the peripheral and central nervous systems, and that purines are also powerful extracellular messengers to non-neuronal cells, including exocrine and endocrine, secretory, endothelial, bone, immune and inflammatory cells (1).

Implicit in the purinergic hypothesis was the presence of purinoceptors (2). A basis for distinguishing P1 (adenosine) from P2 (ATP/ADP) receptors was proposed by Burnstock in 1978. This helped resolve some of the ambiguities in earlier reports, which were complicated by the breakdown of ATP to adenosine by ectoenzymes so that some of the actions of ATP were directly on P2 receptors, while others were due to indirect action via P1 receptors. Four subtypes of P1 receptors were cloned, namely A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 and in 1985, Burnstock and Kennedy proposed a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptor, namely P2X and P2Y, based largely on pharmacological criteria. In the early 1990s, studies of transduction mechanisms and cloning of both P2X and P2Y receptors were carried out, which led Abbracchio and Burnstock to put forward a new nomenclature system in 1994, which is now widely accepted. They proposed that there were two families of P2 purinoceptors, namely P2X ionotropic ligand-gated ion channel receptors and P2Y metabotropic G protein-coupled receptors. This framework has allowed a logical expansion as new receptors were identified. Currently seven subtypes of P2X receptors and eight subtypes of P2Y receptors are clearly recognized and their distribution in the body and pharmacological properties have been defined. The P2X₁ receptor is prominent in contractile smooth muscle cells, but is not detectable in proliferating smooth muscle cells, in which P2Y receptor expression is substantially increased.

Purinergic signalling is rapid in synaptic neurotransmission, neuromuscular transmission leading to contraction or relaxation of smooth muscle and in exocrine or endocrine secretion. However, there are now many examples of purinergic signalling regulating long-term events such as cell proliferation, differentiation, migration and death in development, regeneration and wound healing. Both P2X and P2Y receptors play prominent roles in embryonic development, including the nervous system, cartilage in limb buds, the mesonephros, retina, myotubes and neuromuscular junctions.

There is increasing interest in the therapeutic potential of purinergic compounds in a wide range of disease conditions both in relation to P1 and P2 receptors. A number of purine-related compounds have been patented. The autonomic nervous system shows marked plasticity. Dramatic changes occur in the expression of cotransmitters and receptors during development and ageing, in nerves that remain after trauma or surgery and in disease conditions. There are several pathological conditions in which the cotransmission of purinergic components is increased. Readers are referred to recent reviews about the therapeutic potential of purinergic signalling (3, 4). Some of the statements made in this article are not supported by more recent reports because a limit of 40 references has been stipulated.

CARDIOVASCULAR SYSTEM

Adenosine and ATP are very much involved in the mechanisms underlying local control of vessel tone as well as cell migration, proliferation, differentiation and death during angiogenesis, atherosclerosis and restenosis following angioplasty (5). ATP, released as a cotransmitter from sympathetic nerves, constricts vascular smooth muscle via P2X receptors, while ATP released from sensory-motor nerves during «axon reflex» activity dilates vessels via P2Y receptors. Further, ATP released from endothelial cells during changes in flow (shear stress) or hypoxia acts on P2Y receptors in endothelial cells to release nitric oxide (NO) resulting in relaxation. Adenosine, produced by the breakdown of extracellular ATP, causes vasodilatation via smooth muscle P1 receptors. P2X receptors are also present on endothelial cells and appear to be associated with cell adhesion and permeability.

There have been very promising developments concerning purinergic antithrombotic drugs. Platelets are known to express both P2Y₁, P2Y₁₂ and P2X₁ receptors. «Mega» clinical trials (CAPRIE and CURE) have provided clear evidence that the purinergic antithrombotic drugs clopidogrel and ticlopidine, which are antagonists to the platelet P2Y₁₂ receptor, reduce the risks of recurrent strokes and heart attacks, especially when combined with

aspirin. There are genetic variations in P2Y₁ and P2Y₁₂ receptor gene sequences in healthy subjects that explain variations in the platelet response to ADP; this may reflect individual variation in atherothrombotic risk and the efficacy of purinergic antithrombotic drugs. Postoperative carotid thrombosis is a significant risk for stroke; it seems likely that clopidogrel or ticlopidine may provide an avenue for targeted antiplatelet therapy following vascular intervention. Platelet aggregation in response to ADP is significantly inhibited in patients with peripheral vascular disease two to four hours after a loading dose of clopidogrel. There is a synergistic interaction between ATP and noradrenaline in stimulating platelet aggregation, which suggests a prothrombotic role for ATP in stress. Leishmania-infected dogs show changes in haemocoagulative functions and there is a significant decrease in ADP- and collagen-induced platelet aggregation. Platelet activation that occurs in human acute malaria infection is associated with elevated plasma ATP concentrations.

Upregulation of P2X₁ and P2Y₂ receptor mRNA in the hearts of rats with congestive heart failure has been reported. ATP and adenosine are widely used for the treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia in both infants and adults. The substantial enhancement of mechanical performance with 2-deoxy-ATP in cardiac muscle suggests that it may be a better substrate for contractility than ATP and suggests that ribonucleotide reductase may be a target for therapy in heart failure. Enhanced adrenergic activity causes cardiac dysfunction, arrhythmias and sudden cardiac death in myocardial ischaemia; a novel role for the ectonucleotidase, E-NTPDase 1 or CD39 (an ectoADPase), at sympathetic nerve terminals may offer a novel therapeutic approach to hyperadrenergic states such as myocardial ischaemia and its consequences and since it also inhibits platelet aggregation, for the treatment of thrombotic diatheses. ATP was shown to inhibit atrioventricular conduction rather than the firing rate of sinoatrial nodes in patients with ischaemic heart disease; injection of ATP is used only when a transient cardiac standstill was needed, such as for endovascular grafting surgery. The implantable cardioverter defibrillator reduces the mortality of patients with ventricular arrhythmias. Employing transgenic overexpression of human P2X₄ receptors, cardiac P2X₄

receptors have been shown to have a beneficial life-prolonging role in heart failure; increased expression or activation of these ATP-stimulated receptor channels may represent a new therapeutic approach to the treatment of heart failure (6). Administration of ATP during sinus rhythm has been suggested as a useful bedside test for identifying patients with concealed accessory pathway who are prone to atrioventricular reentrant tachycardia.

ATP release from red blood cells is increased in pathological conditions such as subarachnoid haemorrhage, largely because there is widespread blood cell lysis. This leads to transient constriction of arterioles via P2X receptors and a sustained constriction of large cerebral vessels, largely through P2Y₂ receptors. The differences in purinergic receptor distribution between macro- and microvessels in the cerebral circulation are likely to have important consequences in pathological conditions. In contrast, red blood cells of humans with primary pulmonary hypertension, fail to release ATP in response to mechanical deformation. This is likely to result in the loss of local control of total pulmonary vascular resistance in the lung.

Magnesium-ATP has been recommended for the treatment of ischaemia, radiation injury, shock and sepsis for many years. Treatment of myocardial ischaemia and reperfusion by ATP-MgCl₂ is still recommended, but many reports suggest that adenosine (a break-down product of ATP) also mediates this effect. Diadenosine tetraphosphate (AP₄A) protects against injuries induced by ischaemia and 6-hydroxytryptamine in rat brain and has been suggested as a potentially useful target molecule in the therapy of stroke and Parkinson's disease. Upregulation of P2X₂ and P2X₄ receptors in organotypic cultures of hippocampus, cortex and striatum is associated with ischaemic cell death and was prevented by P2 receptor antagonists. The protective effect of ATP-MgCl₂ in ischaemia-reperfusion lung injury appears to require the presence of leukocytes.

ATP plays a significant cotransmitter role in sympathetic nerves supplying hypertensive blood vessels. The purinergic component is increased in SHR (2). ATP is a rapidly acting hypotensive agent that compares favourably with sodium nitroprusside. ATP-MgCl₂ is a safe,

effective and preferential pulmonary vasodilator in children with pulmonary hypertension secondary to congenital heart defects; it has also been used for treating pulmonary hypertension after cardiac surgery. EPA, one of the active components in fish oil that has antihypertensive effects, increases the release of ATP from vascular endothelial cells leading to reduction of the blood pressure rise characteristic of ageing.

Varicose veins are characterised by hypoxia, inflammation and cell death, all likely to lead to increases in extracellular ATP. P2X₁ and P2X₇ receptors are expressed by saphenous vein smooth muscle and it has been suggested that resultant P2X₇ receptor activation contributes to the decrease in contractile myocytes and resulting disorganisation of the vessel wall. P2 receptors have been proposed as potential new players in atherosclerosis (7). Large clinical trials with clopidogrel and ticlopidine (P2Y₁₂ receptor antagonists) in patients with atherosclerotic disease have shown significant benefit compared with aspirin.

Saphenous vein, internal mammary and radial arteries have been used as grafts for coronary bypass surgery; the level of endothelial P2Y₂ receptors is comparable in all three vessels, but endothelial P2X₄ receptors vary from high in saphenous vein to significantly lower in the other two vessels. It has been suggested that P2X₄ receptors play a more significant role in intense proliferation in arteriosclerosis and restenosis in the P2Y₂ receptors reflected by susceptibility of saphenous vein grafts to atherosclerosis compared to internal mammary arteries. In another study, P2X₁ and P2Y₆ receptors mediate more prominent contractions in the saphenous vein compared to the internal mammary artery; it has been suggested that selective antagonists to these receptors may prevent vasospasm and restenosis in the saphenous vein during and after revascularisation surgery. A novel role for the P2Y₂ receptors has been suggested whereby UTP induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells that mediates the recruitment of monocytes; this may be associated with the development of atherosclerosis. The long-term (trophic) roles of purinergic signalling in vascular smooth muscle and endothelial cell proliferation and death, have been implicated in atherosclerosis and restenosis and suggest the exploration of therapeutic strategies in relation to these events (5).

It has been proposed that there is prognostic value of stress myocardial perfusion imaging using ATP at the beginning of haemodialysis treatment in patients with end-stage renal disease.

DERMATOLOGY

Purinergic signalling is much involved in keratinocyte turnover in skin epidermis: P2Y₁ and P2Y₂ receptors in basal and parabasal layers mediate cell proliferation; P2X receptors in the granular layer mediate cell differentiation; and P2X₇ receptors at the stratum granulosum/stratum corneum border mediate apoptosis (8). There are changes in the expression of P2 receptors in proliferative disorders of the epidermis, including psoriasis and scleroderma and P2Y₂ receptors have been proposed as a novel target for therapy of these disorders.

There is an increase of P2X₃ and P2X_{2/3} nociceptive receptors on sensory nerve endings in inflamed skin and antagonists are being developed as analgesics (**see section on Pain**); data have been presented to support a pathogenic role for keratinocyte-derived ATP in irritant dermatitis.

Changes in expression of purinergic receptors in the regenerating epidermis in wound healing have been described. The P2X receptor antagonist, PPADS, has been shown to accelerate skin barrier repair and prevent epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption.

Purinergic signalling involved in skin tumours is discussed in the section on Oncology.

DIABETES

Early studies from the laboratory of Loubatières-Mariani showed that P2Y receptors are present on pancreatic b-cells and are involved in insulin secretion. ATP stimulates pancreatic insulin release through a glucose-dependent P2Y receptor-mediated mechanism, and also modulates insulin secretion through interactions with

ATP-sensitive potassium channels in islet β -cells. Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion.

P2Y purinoceptors appear to be impaired in fibroblasts from Type 2 diabetic patients, which results in reduced glucose (GLUT 1) uptake, suggesting that P2Y receptors may be candidate targets for the design of innovative antidiabetic drugs. Hormone-specific defects in insulin regulation of ATPase is seen in non-insulin-dependent diabetic rats that may contribute to their insulin resistance.

A feature of diabetic retinopathy is the apoptotic death of microvascular pericytes and endothelial cells; there appears to be an enhancement of P2X₇-induced pore formation and apoptosis in early diabetes on the retinal microvasculature. In streptozotocin-diabetic animals, P2X₇ receptor expression, located in glucagon-containing cells in pancreatic islets, increases and migrates centrally to take the place of the insulin-containing β -cells, although the functional significance of this is not known. The potential role of purinergic compounds as novel treatments for diabetes has yet to be explored. Stimulation of insulin secretion and improvement of glucose tolerance in rats and dogs by the P2Y receptor agonist adenosine-5'-(2-thiodiphosphate) has been claimed.

ENDOCRINE AND FAT CELLS

Purinoceptors are widely expressed in endocrine glands (1). For example, ATP and UTP increase cytosolic free calcium in human thyrocytes, ATP modulates aldosterone production by adrenal cortex, ATP regulates prolactin release from anterior pituitary and vasopressin and oxytocin secretion from posterior pituitary. ATP stimulates insulin release from endocrine pancreas, ATP and UTP inhibit oestrogen and progesterone secretion from the ovary and mediate increases in intracellular calcium in Sertoli cells from testis. Recent observations reveal a wide diversity of actions of purines in the pituitary, including trophic effects and cytokine production as well as actions in hormone release, with implications for pathological as well as physiological states.

ATP, released as a cotransmitter from sympathetic nerves, has been shown to stimulate brown adipocytes. Deficits in receptor regulation, transporter mobilization and adipocyte hormone secretion are all thought to contribute to the pathology of obesity. A recent paper described stimulation of lipogenesis in rat adipocytes by ATP, which regulates fat stores independently from established hormones.

GASTROENTEROLOGY

Purinergic signalling plays a major role in different activities of the gut (9). ATP is a cotransmitter in NANC nerves responsible for the inhibitory phase in peristalsis; it participates in synaptic transmission in the myenteric and submucosal ganglia; it is involved in vascular control of the gastrointestinal tract and in the control of mucosal secretion. Both glial cells and interstitial cells of Cajal express P2 receptors, although their roles have yet to be clarified.

A limited number of studies have been conducted to date on changes in purinergic signalling in the diseased gut. ATP and adenosine have been implicated in the development of gastric ulcers, Hirschsprung's and Chagas' diseases, ischaemia and colonic tumours (9). Extracellular nucleotides and their receptors have been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). T cells are thought to play a primary role in the induction of epithelial cell damage in IBD and the P2Y₆ receptor was found to be highly expressed on the T cells infiltrating IBD, but absent in T cells of unaffected bowel. This suggests that P2Y₆ receptor and its selective agonists, may play a role in the pathogenesis of IBD. Later papers have shown that P2Y₆ receptors are involved in monocytic release of IL-8 and stimulation of NaCl secretion. P2X₃ receptor expression is increased in the enteric plexuses in human IBD, suggesting a potential role in dysmotility and pain. During inflammation of the gastrointestinal tract, glial cells proliferate and produce cytokines; thus, P2X₇ receptors may play a role in the response of enteric glia to inflammation. P2X₃ purinergic signalling enhancement in an animal model of colitis has been described (10). A recent paper has raised the possibility that P2X receptors are potential targets

for the drug treatment of irritable bowel syndrome (11). Bile induces ATP depletion and contributes to the early mucosal permeability alteration and barrier lesions that occur during experimental oesophageal reflux. P2X₃ immunohistochemistry has been demonstrated in aganglionic bowel in Hirschsprung's disease, suggesting that the sensory nerves may form a significant proportion of its hypertrophic innervation. P2Y receptors in smooth muscle and ATP production in myenteric neurons increase in postoperative ileus, probably contributing to delayed colonic transit. An inhibitor of purinergic transmission, OrphaninFG, reversed postoperative ileus in rats and therefore may have therapeutic application. Recent reviews have highlighted the potential of purinergic drugs for the treatment of functional bowel disorders and visceral pain (11).

Intrinsic sensory neurones in the submucous plexus of the gut, as well as extrinsic sensory nerves, show positive immunoreactivity for P2X₃. It has been proposed (12) that during moderate distension, low threshold intrinsic enteric sensory fibres may be activated via P2X₃ receptors by ATP released from mucosal epithelial cells, leading to reflexes concerned with propulsion of material down the gut. Studies showing that peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit support this view. In contrast, during substantial (colic) distension associated with pain, higher threshold extrinsic sensory fibres may be activated by ATP released from the mucosal epithelia; these fibres pass messages through the dorsal root ganglia to pain centres in the central nervous system (10).

In the liver, purinergic receptors have been identified in the plasma membrane of the two principal epithelial cell types that form the bile secreting unit, namely hepatocytes, which constitute the liver parenchymal cells and cholangiocytes, which line the lumen of intrahepatic bile ducts. Activation of the receptors has been linked to several fundamental responses important to cellular metabolism, ion channel activation, cell volume regulation and bile formation. It is suggested that pharmacological modulation of ATP release and purinergic signalling might provide novel strategies for the management of cholestasis and other disorders characterised by impaired bile flow. Purinergic receptors are present on both quiescent and activated hepatic stellate cells; quiescent cells express

P2Y₂ and P2Y₄ receptors activated by UTP and ATP, whereas activated cells express P2Y₆ receptors activated by UDP and ATP. It has been speculated that the P2Y receptors on satellite cells may be an attractive target to prevent or treat liver fibrosis, via regulation of procollagen-1 transcription. ATP has been shown recently to rapidly activate multiple components of the c-jun N-terminal kinase (JNK) cascade, a central player in hepatocyte proliferation and liver regeneration. This study identifies extracellular ATP as a hepatic mitogen with implications about the regulation of liver growth and repair.

The effect of ATP on salivary glands has been recognised since 1982. Both P2X and P2Y subtypes are expressed and opportunities for utilization of these receptors as pharmaceutical targets for diseases involving salivary gland dysfunction appear promising.

IMMUNE SYSTEM AND INFLAMMATION

ATP and adenosine are released at sites of inflammation. ATP is involved in the development of inflammation through a combination of actions: release of histamine from mast cells, provoking production of prostaglandins, and the production and release of cytokines from immune cells. In contrast, adenosine exerts anti-inflammatory actions. P2X₇ and P2Y₁ and P2Y₂ receptors located on inflammatory and immune cells play a pivotal role in inflammation and immunomodulation (13).

In addition to the roles of purines in inflammation, they have a broad range of functions carried out through purinergic receptors on immune cells, including killing intracellular pathogens by inducing apoptosis of host macrophages, chemoattraction and cell adhesion. Purinergic compounds may turn out to be useful for the treatment of neurogenic inflammation, rheumatoid arthritis and periodontitis.

ATP-induced apoptosis in macrophages via P2X₇ receptors, also results in killing of the mycobacteria contained within them, in contrast, to the macrophage apoptoses produced by other agents; elucidation of the bacterial killing mechanism initiated by the P2X₇

receptor may help to devise new strategies to combat the most potent and enduring of human pathogens (14). Infection with M. tuberculosis causes macrophages to release ATP, which leads to oxygen-radical production, providing antibacterial effects at sites of infection. In later studies, it was shown that the ATP-induced bactericidal activity towards virulent M. tuberculosis requires an increase in cytosolic Ca^{2+} in infected macrophages and it was hypothesised that the Ca^{2+} -dependence was linked to promotion of phagosome-lysosome fusion. The P2X₇ receptor plays a fundamental role in lipopolysaccharide signal transduction and activation of macrophages and may therefore represent a therapeutic target for Gram-negative bacterial septicaemia. Vibrio cholerae, the causative organism of the intestinal disease cholera, secretes enzymes that lead to ATP degradation; this may allow the pathogen to evade the immune system by reducing the apoptotic actions of the P2X₇ receptor. Evidence has been presented to support the view that, while the cytotoxic actions of ATP on macrophages was via P2X₇ receptors, the bacteriocidal effects of ATP (and UTP) were probably via P2Y₂ receptors.

ATP moderates anti-IgE-induced release of histamine from lung mast cells and may therefore be mechanistically involved in human allergic/asthmatic reactions. Alveolar macrophages express P2X₇ receptors, which upon stimulation trigger pro-inflammatory responses, including activation of IL1-6 cytokines and granulomatous reactions (15).

Extracellular ATP inhibits the activation of CD4⁺T lymphocytes via P2Y receptors, which suggests a novel therapeutic target for topical immunosuppression in eye, skin or airway inflammatory disease. In addition to the apoptosis mediated by P2X₇ receptors, a lower level of activation sometimes results in cell proliferation; it has been suggested that the expression and function of P2X₇ receptors on B lymphocytes may correlate with the severity of B-cell chronic lymphocytic leukaemia.

During the acute phase of Trypanosoma cruzi infection, the etiologic agent of Chagas' disease, thymic atrophy occurs; ATP also induces cell death in CD4⁺/CD8⁺ double-positive thymocytes and may play a central role in thymus atrophy during T. cruzi infection.

Infection by the parasitic blood fluke Schistosoma mansoni also leads to thymic atrophy. The cloning and characterisation of a P2X receptor (schP2X) from Schistosoma mansoni provides the first example of a non-vertebrate ATP-gated ion channel and may provide an alternative drug target for the treatment of schistosomiasis.

A novel mechanism by which ATP, probably via P2Y₁₁ receptors, can regulate the trafficking of specific dendritic cell populations has been described. The migration of dendritic cells from the site of antigen capture to lymphoid tissue is a prerequisite for the induction and regulation of immune responses. Therefore, ATP-mediated inhibition of migration could play an important role in inflammatory disease and cancer. Targeting of P2Y₁₁ receptors may provide a new therapeutic strategy to improve the migration of dendritic cells to induce the trafficking of antigen from the vaccine site to the draining lymph nodes.

Allopurinol and captopril have a therapeutic effect on granulomatous disorders, such as sarcoidosis, by a direct action on monocyte/macrophage lineage cells partly by downregulation of intracellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) and P2X₇ receptors. ATP and UTP have been shown to be potent stimulators of human haematopoietic stem cells both *in vitro* and *in vivo*. Thus, these extracellular nucleotides may provide a novel and powerful tool to modulate haematopoietic stem cell function to increase the number of transplantable cells *in vivo* in the event of bone marrow failure. P2X₇ receptors control endocannabinoid production by microglia cells and might constitute promising therapeutics to temper exacerbated microinflammatory responses and allied cell damage.

MIGRAINE

Classical migraine is associated with two distinct cerebrovascular phases; an initial vasoconstriction (not associated with pain) followed by vasodilatation (reactive hyperaemia) associated with pain. The “purinergic” hypothesis for migraine was originally put forward by Burnstock in 1981 as a basis for the reactive hyperaemia and pain during the headache phase. It was suggested that ATP and its breakdown products adenosine 5'-monophosphate and adenosine

were strong contenders for mediating the vasodilatation following the initial vasospasm and subsequent hypoxia. ATP was also implicated in the pathogenesis of pain during migraine via stimulation of primary afferent nerve terminals located in the cerebral vasculature. Recent studies have shown that the ATP-induced cerebral vasodilatation is endothelium-dependent via activation of P2Y-purinoceptors on the endothelial cell surface and subsequent release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF); and that the endothelial cells are the main local source of ATP involved, although ADP and ATP released from aggregating platelets may also contribute to this vasodilatation. These findings have extended the «purinergic» hypothesis for migraine in two ways. Firstly, they have clarified the mechanism of purinergic vasodilatation during the headache phase of migraine. Secondly, they suggest that a purinergic mechanism may also be involved in the initial local vasospasm, via P2X-purinoceptors on smooth muscle cells occupied by ATP released either as a cotransmitter with noradrenaline from perivascular sympathetic nerves or from damaged endothelial cells. The hypothesis has gained further support by the identification of P2X₃ receptors on primary afferent nerve terminals arising from trigeminal, nodose and spinal ganglia (12). Thus, P2X₃ receptor antagonists may be candidates for antimigraine drug development (16). There is also recent evidence that migraine is a chronic sympathetic nervous system disorder, where there is an increase in release of sympathetic cotransmitters, including ATP, which may contribute to the initial vasospasm.

MUSCULOSKELETAL SYSTEM

Several reports implicate purinergic signalling in bone development and remodelling. P2X and P2Y receptors are present on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes (17). ATP, but not adenosine, stimulates the formation of osteoclasts and their resorptive actions *in vitro*, and can inhibit osteoblast-dependent bone formation. The bisphosphonate clodronate, which is used in the treatment of Paget's disease and tumour-induced osteolysis, may act through osteoclast P2 receptors. Very low (nM) concentrations of ADP acting through P2Y₁ receptors turn on osteoclast activity.

In a recent study, deletion of the P2X₇ receptor revealed its regulatory roles in bone formation and resorption. It reduces bone resorption by decreasing osteoclast survival (18). The multiple purinoceptors on bone and cartilage also represent potential targets for the development of novel therapeutics to inhibit bone resorption in diseases such as rheumatoid arthritis, osteoporosis, tumour-induced osteolysis and periodontitis.

Nucleotide metabolism is tightly controlled in the cartilage extracellular matrix. Apart from modulating purinoceptor activation, ectoenzymes can regulate the levels of extracellular phosphate and pyrophosphate, the components involved in crystal deposition. Mechanical stimulation, which is critical for the maintenance of healthy articular cartilage, can influence the rate of nucleotide release and metabolism. The repair of foetal, but not adult, articular cartilage involves the intercellular transfer of ATP, increase of $[Ca^{2+}]_i$ and expression of cfos in cartilage.

Tendinosis is a disorder characterised by acute or chronic pain and degenerative change in the matrix. Mechanical loading induces ATP release from tendon cells and stimulates expression of interleukin IL-1 β , Cox2 and metalloproteinases as a negative feedback mechanism to limit activation of the injurious pathway. Attenuation of the feedback mechanism may result in the progression of tendinosis.

Ultrasound is often used to accelerate fracture healing. It has been shown recently that osteoblasts respond to ultrasound stimulation by increasing ATP release, which appears to mediate stimulation of osteoblast gene expression and cell proliferation.

A role for purinergic signalling in rheumatic diseases has been considered for some time. Quinacrine (Atabrine), a drug that binds strongly to ATP, has been used for the treatment of rheumatoid arthritis patients for many years, one of its mechanisms of action being to decrease levels of prostaglandin E₂ and Cox-2, which are known to be produced following occupation of P2Y receptors by ATP. The articular fluid removed from arthritic joints contains high levels of ATP. Purinergic regulation of bradykinin-induced plasma extravasation and adjuvant-induced arthritis has been reported. ATP and UTP activate calcium-mobilizing P2Y₂ or P2Y₄ receptors and act

synergistically with interleukin-1 to stimulate prostaglandin E₂ release from human rheumatoid synovial cells. More recently, relief of inflammatory pain by the P2X₇ receptor antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats has been reported (19). Spinal P1 receptor activation has been claimed to inhibit inflammation and joint destruction in rat adjuvant-induced arthritis, supporting the view that therapeutic strategies that target the CNS might be useful in arthritis. Suppression of experimental Zymosan-induced arthritis by intraperitoneal administration of adenosine has also been described.

Lymphoblastoid cells isolated from Duchenne muscular dystrophy patients are highly sensitive to stimulation by extracellular ATP. A recent study provides the first evidence for a role for purinergic signalling in muscle regeneration using the mdx mouse model of muscular dystrophy and raises the possibility of new therapeutic strategies for the treatment of muscle disease (20). Pain related to the musculoskeletal system (myofascial pain) is very common and ATP has been claimed to excite or sensitize myofascial nociceptors.

NEPHROLOGY

There is a substantial presence of purinoceptors in different regions of the nephron, the glomerulus and renal vascular system in the kidney, including subtypes involved in the regulation of renin secretion, glomerular filtration and the transport of water, ions, nutrients and toxins (21). ATP and adenosine have been used to protect kidneys from renal ischaemic-reperfusion injury, and are being explored for the treatment of chronic renal failure and transplantation-induced erythrocytosis. It has been proposed that luminal P2 receptors in the nephron are part of an epithelial «secretory» defence mechanism against bacteria or harmful particles involved in the regulation of cell volume when transcellular solute transport is out of balance. P2Y receptors mediate renin secretion. ATP released from macula densa cells, serves as the major paracrine agent mediating tubuloglomerular feedback signals to regulate afferent arteriolar resistance.

Cyclosporine is a potent immunosuppressive agent, but its use has been limited by the side effect of nephrotoxicity; however, ATP

treatment after verapamil pre-treatment greatly reduces the nephrotoxic potential. The P2 receptor antagonist, PPADS, has been shown to be an effective inhibitor of mesangial cell proliferation in an experimental rat model of mesangial proliferative glomerulonephritis.

In polycystic kidney disease, tubules are altered, leading to dilated tubules or cysts encapsulated by a single monolayer of renal epithelium. It has been postulated that autocrine purinergic signalling may augment detrimentally cyst volume expansion, accelerating the disease progression. An increase in expression of P2Y₂, P2Y₆ and P2X₇ receptors has been reported in cystic tissue from the Han: SPRDcy/+rat model of autosomal dominant polycystic kidney disease. P2 antagonists and inhibitors of ATP release are being explored as therapeutic agents to treat this disease. ATP may inhibit pathological renal cyst growth through P2X₇ signalling. There is increased glomerular expression of P2X₇ receptors in two rat models of glomerular injury due to diabetes and hypertension (22). A further study of human and experimental glomerulonephritis also shows increase in P2X₇ receptor expression.

Administration of ATP complexed with MgCl₂ has been used for many years to improve post-ischaemic and drug-induced glomerular and tubular function. There is convincing evidence that there is increased sympathetic activity in renal disease, especially ischaemia. Since ATP is established as a cotransmitter with noradrenaline in sympathetic nerves, this may be a source of enhanced ATP in these conditions.

NEUROLOGY

ATP is a cotransmitter in many nerve types, probably reflecting the early evolutionary presence of purinergic signalling (23). There is now evidence for ATP as a cotransmitter with noradrenaline (NA) and neuropeptide Y (NPY) in sympathetic nerves, with acetylcholine and vasoactive intestinal peptide (VIP) in some parasympathetic nerves, with nitric oxide (NO) and VIP in enteric NANC inhibitory nerves, and with calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory-motor nerves. There is also evidence for

the cotransmission of ATP with g-aminobutyric acid in retinal nerves, and with glutamate, 5-hydroxytryptamine (serotonin), NA or dopamine in nerves in the brain. In sympathetically innervated tissues, such as the vas deferens or blood vessels, ATP produces fast responses mediated by P2X receptors, followed by a slower component mediated by G protein-coupled α -adrenoceptors. Similarly, in the parasympathetic nerves supplying the urinary bladder, ATP provokes a fast transient response via P2X receptors, while the slower component is mediated by G protein-coupled muscarinic receptors. There are differences in the proportion of cotransmitters between species and in different pathophysiological conditions. P2X₃ receptors are selectively localised on sensory neurons in trigeminal, nodose and dorsal root ganglia (DRG), and the terminals of these nociceptive neurons in the skin and visceral organs represent unique targets for novel analgesic agents that function as P2X₃ receptor antagonists. Non-specific P2 receptor antagonists, eg suramin, are antinociceptive, and P2X₃ receptor-knockout mice have reduced nociceptive inflammatory responses (12). The first clear evidence for nerve-nerve purinergic synaptic transmission was published in two papers in Nature in 1992. Synaptic potentials in the coeliac ganglion and in the medial habenula in the brain were reversibly antagonised by suramin, a P2X antagonist. Since then, many articles have described either the distribution of various P2 receptor subtypes in the brain and spinal cord or electro-physiological studies of the effects of purines in brain slices, isolated nerves and glial cells (23). Synaptic transmission has also been found in the myenteric plexus and in various sensory, sympathetic and pelvic ganglia. Adenosine, produced by the ectoenzymatic breakdown of ATP, acts through presynaptic P1 receptors to inhibit the release of excitatory neurotransmitters in both the peripheral and the central nervous systems. P2Y receptors are expressed on both nonmyelinating and myelinating Schwann cells.

In the brain, purinergic signalling is involved in the regulation of a variety of physiological and pathophysiological processes, including development and nervous tissue remodelling following trauma, stroke, ischaemia or neurodegenerative disorders (23). Agonists and antagonists of adenosine and ATP are being explored as therapeutic agents for a number of neurological conditions. For example,

microinjection of ATP analogues into the prepiriform cortex induces generalised motor seizures. P2X₂, P2X₄ and P2X₆ receptors are expressed in the prepiriform cortex, suggesting that a P2X receptor antagonist may have potential as a neuroleptic agent. The hippocampus of chronic epileptic rats shows abnormal responses to ATP associated with increased expression of P2X₇ receptors; it has been suggested that purinergic receptors (perhaps on microglia) may participate in the pathophysiology of temporal lobe epilepsy.

In nervous tissue, trophic factors ensure neuronal viability and regeneration. Neuronal injury releases fibroblast growth factor, epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. In combination with these growth factors, ATP can stimulate astrocyte proliferation, contributing to the process of reactive astrogliosis and to hypertrophic/hyperplastic responses. P2Y receptor antagonists have been proposed as potential neuroprotective agents in the cortex, hippocampus and cerebellum, by modulation of kainate and AMPA-induced currents, excessive activation of glutamate receptor systems being implicated in neuronal cell death associated with stroke, epileptic seizures and neurodegenerative diseases such as Alzheimers, Parkinson's, Huntington's and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). P2 receptors have been claimed to mediate neuroprotective effects in the cerebellum and the possibility of the therapeutic use of P2 receptor agonists as neuroprotective agents raised. Upregulation of P2X₁ and P2X₂ receptors after cerebellar lesions has been reported. Purine derivatives are in clinical trials as memory-enhancing agents in Alzheimers disease; two of these, propentofylline and AIT-082 appear to act as trophic effectors, increasing the production of neurotrophic factors in brain and spinal cord. It has been reported that aluminium can produce Alzheimer-like symptoms and a mechanism has been proposed whereby the aluminium binds to ATP to act on P2 purinoceptors leading to formation of amyloid fibrils. Adenosine is claimed to have a protective effect in a rat model of Parkinson's disease, perhaps by upregulating antioxidant states and reducing dopamine loss. Blockade of A_{2A} (P1) receptors antagonises parkinsonian tremor in the rat tacrine model by actions on specific striated regions. Increased A_{2A} receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias has been described recently, which reinforces the

notion that A_{2A} receptor antagonists may be useful for the treatment of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias.

ATP inhibits the release of the excitatory transmitter, glutamate, and stimulates the release of the inhibitory transmitter, GABA, from hippocampal nerves. In addition, ATP coreleased with glutamate induces long-term potentiation (LTP) in CA1 neurons associated with learning and memory (24). Nanomolar concentrations of ATP induce long-lasting enhancement of LTP in hippocampal neurons; the P2 antagonist, suramin, inhibits activity of the ectoenzyme, apyrase, which has been shown to participate in the mechanisms of memory acquisition. It has been suggested that ATP coreleased with glutamate, activates CA1 pyramidal hippocampal neurones, allowing calcium to enter postsynaptic cells and thereby inhibiting the effectiveness of NMDA receptors in inducing LTP. Since P2X receptors contribute to synaptic transmission, mainly at low frequencies of stimulation, they may act as a dynamic low-frequency filter, preventing weak stimuli from inducing long-lasting changes in synaptic efficacy. Large rises in [Ca²⁺]_i in CA1 neurons induce LTP, but small rises induce long-term depression (LTD). ATP and activation of glutamate NMDA receptors leads to potentiation of LTP-CA1 neurons (24) in keeping with the synergism that often occurs between cotransmitters (23). There is expression of functional P2X receptor channels in the axons of CA3 neurons branching to their postsynaptic targets and predominantly in nerve terminals forming synapses with interneurons. ATP released from astrocytes acts as an activity-dependent signalling molecule in neurone-glia communication, resulting in astrocyte Ca²⁺ waves and synaptic modulation; neuron-glia crosstalk may represent an integral part of activity-dependent plasticity of neural networks. Clearly there are multiple roles for P2 and P1 receptors in relation to learning and memory, but the way that therapeutic manipulation of purinergic mechanisms can be utilized to improve these functions is still unresolved. Higher order cognitive functions, including hearing and memory in the prefrontal cortex, also involve purinergic signalling. Adenosine-related compounds might prove helpful in the treatment of memory disorders and impaired intellectual performance related to caffeine intake.

ATP injected into the supraoptic nucleus of the hypothalamus has antidiuretic effects, perhaps through release of arginine

vasopressin via P1 receptors. Purinergic and adrenergic synergism for vasopressin and oxytocin release is consistent with ATP cotransmission in the hypothalamus. Purinergic signalling appears to play a significant role in the regulation of body temperature during fever by central hypothalamic and brainstem nuclei. Functional interactions seem likely to occur between purinergic and nitrenergic neurotransmitter systems; they may be important for regulation of hormone secretion and body temperature at the hypothalamic level and for cardiovascular and respiratory control at the level of the brainstem. ATP is coreleased with GABA or noradrenaline to act on P2 receptors which are strongly expressed in most nuclei in the hypothalamus, including arcuate, paraventricular, retrochiasmatic, supraoptic, ventromedial and dorsomedial.

P2X and GABA_A receptors play an important role in CO₂ chemoreception and are involved in mediation of the ventilatory response to hypercapnia. P2X receptors expressed in neurons in the trigeminal mesencephalic nucleus may be involved in the processing of proprioceptive information. The nucleus tractus solitarius (NTS) is a major integrative centre in the brain stem involved in reflex control of the cardiovascular system; stimulation of P2X receptors in the NTS evokes hypotension with decrease in both cardiac output and total peripheral resistance. Evaluation of the roles of purinergic signalling in processing of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex at the NTS level may illuminate the mechanisms underlying the sympathetic overactivity observed in pathophysiological conditions such as hypertension, obstructive sleep apnea and heart failure.

In the striatum, extracellular ATP and adenosine are involved in the regulation of the feeding-associated mesolimbic neuronal activity in an antagonistic manner. PPADS suppresses the feeding-evoked dopamine release in the nucleus accumbens, a brain region regarded as important for the regulation of appetite behaviour and reinforcement. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum have been implicated in schizophrenia and A_{2A} agonists proposed as antipsychotics. A hypothesis has been put forward where dysfunction of purinergic signalling (for example, decreased ATPase activity in erythrocytes, leading to increased levels of ATP and decreased adenosine) may lead to schizophrenia.

It has been claimed that purinergic signalling dysfunction (perhaps largely reduced adenosinergic activity) is involved in mania and aggressive behaviour. Endogenous ATP has been claimed to be involved in the regulation of anxiety via stimulation of P2Y₁ receptors in the dorsomedial hypothalamus in rats. Chronically administered guanosine has anticonvulsant, amnesic and anxiolytic effects in mice, perhaps associated with modulation of glutamatergic excitation. There is a growing body of evidence suggesting that adenosine is involved in drug addiction and withdrawal, and that purinergic signalling pathways may offer novel targets for the therapeutic treatment of addiction to opioids.

Multiple P2X and P2Y receptors have been identified on single cerebellar granule cells. It has been reported that ATP continuously modulates the cerebellar circuit by increasing the inhibitory input to Purkinje neurons, probably via P2X₅ and P2Y₂ and/or P2Y₄ receptor subtypes, thus decreasing the main cerebellar output activity which contributes to locomotor coordination.

Spinal cord traumas are a major health problem. ATP-MgCl₂ has been shown to decrease lipid peroxidation in spinal cord injury and protect the spinal cord from secondary injury after trauma; it was concluded that ATP-MgCl₂ should be explored for the treatment of spinal cord injuries in conjunction with other treatment modulators.

Phenylketonuria is an innervated deficiency of phenylalanine hydroxylase activity in the liver, which leads to increased brain levels of phenylalanine and its metabolites, leading to permanent brain damage in the early period of postnatal brain development. Phenylalanine has been shown to inhibit ATP diphosphohydrolase resulting in increase in ATP levels, perhaps the neurotoxic mechanism underlying brain damage in this disease.

Glial cells

ATP is an extracellular signalling molecule between neurones and glia. ATP released by cellular damage and from astrocytes may be important in triggering cellular responses to trauma and ischaemia by initiating and maintaining reactive astrogliosis, which involves

striking changes in proliferation and morphology of astrocytes and microglia. Some of the responses to ATP released during brain injury are neuroprotective, but in some cases ATP contributes to the pathophysiology initiated after trauma. It has been claimed that P2Y₂ receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. In contrast, experimental infusion of ATP into nucleus accumbens or cerebral hemisphere of rats suggests that purines might be a signal for induction of malignant brain tumours. Multiple P2X and P2Y receptor types are expressed by astrocytes, oligodendrocytes and microglia. P2Y receptors mediate reactive astrogliosis via induction of Cox-2 and P2Y receptor antagonists might counteract excessive Cox-2 activation in both acute and chronic neurological disease. P2 receptors also mediate regulation of Cox-2 in microglia. IL-1 β -induced astrocyte activation is regulated by purinergic signalling; this is compatible with the hypothesis that nucleotides released under inflammatory conditions activate autocrine or paracrine signalling pathways that modulate inflammation. ATP can activate P2X₇ receptors in astrocytes to release glutamate, GABA and ATP, which regulate the excitability of neurons. ATP release during neuronal excitation or injury can enhance the inflammatory effects of cytokines and prostaglandin E₂ in astrocytes and may contribute to chronic inflammation seen in Alzheimer's disease. Astrocytic gap junctions are involved in the neuroprotective process, in particular to protect neurons from oxidative stress and glutamate toxicity.

Microglia, immune cells of the CNS, are also activated by purines and pyrimidines to release inflammatory cytokines such as interleukins 1 β and 6 and tumour necrosis factor (TNF- α); activated microglia can also act as scavenger cells that induce apoptosis in damaged neurons by releasing toxic factors, including NO. Thus, while microglia may play an important role against infection in the CNS, overstimulation of this immune reaction may accelerate the neuronal damage caused by ischaemia, trauma or neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease, HIV, encephalopathy, multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which exhibit microglial proliferation and activation (25). These authors showed that ATP inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2Y receptors and suggested that P2Y agonists may be a potential treatment for toxic

immunoreactions. Recent studies have shown that P2X₄ receptors induced in spinal microglial gate tactile allodynia after nerve injury (26) (see section on **Pain**). P2X₇ receptors mediate superoxide production in primary microglia and are upregulated in a transgenic model of Alzheimers' disease, particularly around β -amyloid plaques. Stimulation of microglial P2X₇ receptors also leads to enhancement of interferon- γ (IFN- γ)-induced type II nitric oxide synthase activity. P2X₇ receptors may therefore provide a therapeutic target for inflammatory responses seen in neurodegenerative disorders.

P2 receptors are expressed by oligodendrocytes. However, while P2 receptors on oligodendrocytic progenitor cells mediate increase in $[Ca^{2+}]_i$, it is adenosine that appears to mediate the formation of myelin, raising the possibility that activation of purinoceptors may offer new approaches to the treatment of demyelinating diseases in the CNS, such as multiple sclerosis. P2X receptors expressed by Schwann cells may regulate the synthesis and release of cytokines during pathophysiological events.

ONCOLOGY

The anticancer activity of adenine nucleotides was first described by Rapaport in 1983. Intraperitoneal injection of ATP into tumour-bearing mice resulted in significant anticancer activity against several fast-growing aggressive carcinomas (4). ATP inhibits the growth of murine colonic adenocarcinoma and human pancreatic carcinoma in mice as well as inhibiting the associated weight loss. In a recent comprehensive review about the use of ATP for the treatment of advanced cancer (27), evidence was presented that: extracellular ATP inhibits the growth of a variety of human tumours, including prostate, breast, colon, liver, ovarian, colorectal, oesophageal and melanoma cancer cells, partly by mediating apoptotic cancer cell death; ATP administration induces resistance of non-malignant tissue to chemo- and radiation therapy; ATP has pronounced anticachexia effects, particularly in older patients, reducing weight loss, anorexia, and hormonal aberrations, largely via its ability to expand blood plasma ATP pools. It was concluded that preclinical data supporting utilization of ATP in the treatment of advanced cancers, along with

Phase I and II human trials indicate that ATP has a future place as a useful anticancer agent. The combination of ATP administration with other anticancer modalities is beginning to be explored.

Growth of prostate-cancer cells *in vitro* is inhibited by up to 90% by ATP via P2 receptors, although it is not yet clear which subtype mediates this effect and whether it is a directly antiproliferative effect or a proapoptotic effect (28). Phase I clinical trials have shown that ATP infusion in patients with advanced cancer is feasible, but is limited by chest tightness and dyspnoea, probably due to conversion to adenosine.

A phase II trial has been carried out in patients with non-small cell lung cancer, showing that intravenous ATP administered for 96 hours at 4-week intervals reduced weight loss and improved muscle strength and quality of life, as well as inducing cancer cell death (4).

A combination of interferon- γ and ATP is being explored for the treatment of acute myeloid leukaemia. ATP induced irreversible damage of leukemic cells without injuring normal hemopoietic stem cells, and it was suggested that it could be useful for purging the residual leukaemic cells in autologous bone marrow transplantation. Extracellular ATP suppresses proliferation and induction of differentiation of human HL-60 leukaemia cells, partly mediated by adenosine (after breakdown of ATP) and partly by ATP. P2X₇ receptor expression in the evolutive form of chronic β lymphocyte leukaemia has been identified; ATP decreased proliferation of lymphocytes in this form of leukaemia. β -cell chronic lymphocyte leukaemia is unique in showing a three-fold increased incidence in closely related family members compared to other lymphoproliferative diseases; a candidate gene for this familial incidence is the P2X₇ gene.

Recent studies from our laboratory have analysed the P2 receptor subtypes that contribute to ATP suppression of malignant melanomas (29) in basal and squamous cell tumours (30) and prostate and bladder cancers (28). In general, P2Y₁ and P2Y₂ receptors mediate proliferative or antiproliferative effects, P2X₅ receptors mediate cell differentiation, which in effect is antiproliferative and P2X₇ receptors mediate apoptotic cell death. ATP administration is particularly effective in treating bladder tumours when combined with the more commonly used anticancer drug mitomycin.

Intracarotid administration of ATP, selectively increases blood flow in transplanted, malignant gliomas and suggests that this might enhance the delivery of anti-cancer agents to malignant brain tumours.

PAIN

The involvement of ATP in the initiation of pain was recognised early, by Collier et al. in 1966 and Bleehan & Keele in 1977. A major advance was made when the P2X₃ ionotropic receptor was cloned in 1995 and shown to be localised predominantly in the subpopulation of small nociceptive sensory nerves that label with isolectin IB4 in dorsal root ganglia. Later, Burnstock (31) put forward a unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain associated with causalgia, reflex sympathetic dystrophy, angina, migraine and cancer pain, which has been followed by an increasing number of papers expanding on this concept for acute, inflammatory, neuropathic and visceral pain. Sensory terminals are sensitive to ATP and α , β -methylene ATP in the tongue, tooth pulp, bladder (32), ureter (33) and gut (10). Both P2X₃ (homomultimer) and P2X_{2/3} (heteromultimer) receptors mediate nociceptive afferent responses, but the proportions vary in different organs. P2Y receptors have also been demonstrated in a subpopulation of sensory neurons which colocalise with P2X₃ receptors.

The search is on for selective P2X₃ and P2X_{2/3} receptor antagonists that do not degrade *in vivo*. PPADS is a non-selective P2 antagonist, but has the advantage that it dissociates about 100-10,000 times more slowly than other known antagonists. The trinitrophenyl-substituted nucleotide, TNP-ATP, is selective and very potent at both P2X₃ and P2X_{2/3} receptors. A-317491 is a potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors and it reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat (34). Antisense oligonucleotides have been used to downregulate the P2X₃ receptor and in models of neuropathic (partial sciatic nerve ligation) and inflammatory (complete Freund's adjuvant) pain, inhibition of the development of mechanical hyperalgesia as well as significant reversal of established hyperalgesia, were observed within 2 days of

treatment. Combined antisense and RNAi-mediated treatment for specific inhibition of the recombinant rat P2X₃ receptor appears to be promising for pain therapy. Cytotoxic targeting using IB4-saporin conjugate of isolectin IB4-binding nociceptive sensory neurons decreases the severity to noxious stimuli. Antagonism of P2X₁ and P2X₃ receptors by phenol red has recently been reported and shown to cause significant increase in pressure and volume threshold required to initiate the micturition reflex in female urethra-anaesthetised rats. Modulation of neurotransmission through P2X₃ receptors in central and peripheral nervous systems may contribute to the anaesthesia and analgesia produced by barbiturates. Tetramethylpyrazine, a traditional Chinese medicine, used as an analgesic for dysmenorrhoea, inhibited significantly the first phase of nociceptive behaviour induced by 5% formalin and attenuated slightly the second phase in the rat hindpaw pain model. Interactions between vanilloid and metabotropic P2Y receptors are also being explored in terms of treatments for chronic pain and thermal hypersensitivity.

For neuropathic pain, the tactile allodynia that follows peripheral nerve injury is reduced by A-134974, a novel adenosine kinase inhibitor acting at spinal sites. Endogenous ATP acting on P2X receptors appears to be necessary for the induction of the postoperative pain characterised by mechanical allodynia. Upregulation of P2Y₁ receptor expression in DRG occurs after transection of sciatic nerves. P2X₄ receptors are induced in spinal microglia that appear to gate tactile allodynia after nerve injury (26). Intraspinal administration of p38 inhibitor suppressed allodynia, which suggests that neuropathic pain hypersensitivity depends on the activation of p38 signalling pattern in microglia in the dorsal horn following peripheral nerve injury. Suramin inhibits spinal cord microglia activation and long-term hyperalgesia induced by formalin injection. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y receptor agonists UTP and UDP in normal and the neuropathic pain rat model have been reported suggesting that P2Y₂ (and P2Y₄) and P2Y₆ receptors, in contrast to P2X receptors, produce inhibitory effects in spinal pain transmission. Purinergic mechanisms are also beginning to be explored in relation to cancer pain.

RESPIRATORY SYSTEM

Purinergic compounds are being explored for the treatment of cystic fibrosis, to improve the clearance of secretions from the bronchi in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and for sputum expectoration in smokers (35). The long lasting P2Y₂ analogue, INS 37217, increases the duration of mucociliary clearance and therefore has significant advantages over other P2Y₂ agonists for the treatment of cystic fibrosis. P2X₄ receptors have also been identified on lung epithelial cells and appear to be involved in regulation of ciliary beat, manipulation of which may also be of therapeutic benefit for cystic fibrosis. Recent evidence supports the view that vagal afferent purinergic signalling may be involved in the hyperactivity associated with asthma and COPD (36).

Pulmonary hypertension can be a problem in patients with COPD which also has other causes; it is a life-threatening condition, and intravenous ATP infusion produces a significant decrease in mean pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance without changing the mean systemic arterial pressure.

The use of theophylline, an adenosine-receptor antagonist, as an antiasthmatic agent has focused attention on the development of novel P1 receptor antagonists as asthmatic medications.

Erythromycin is a widely used antibiotic for the treatment of upper and lower respiratory tract infections. One of the most conspicuous effects of erythromycin is the suppression of fluid secretion from bronchial epithelial cells in the treatment of bronchitis. Erythromycin has been shown to block the P2X receptor-mediated Ca²⁺ influx and may represent one mechanism by which it exerts its antisecretory effects in the treatment of chronic respiratory tract infections.

The ventrolateral medulla (VLM) contains a network of respiratory neurons that are responsible for the generation and shaping of respiratory rhythm; it also functions as a chemoreceptive area mediating the ventilating response to hypercapnia. Evidence has been presented that ATP acting on P2X₂ receptors expressed in VLM neurones influences these functions. A potentially important role for P2 receptor synaptic signalling in respiratory motor control

is suggested by the multiple physiological effects of ATP in hypoglossal activity associated with the presence of P2X₂, P2X₄ and P2X₆ receptor mRNA in nucleus ambiguus and the hypoglossal nucleus.

The pneumovirus respiratory syncytial virus (RSV) is the most common cause of lower respiratory tract disease in infants and children. It has a detrimental inhibitory effect on alveolar clearance, an effect that appears to be mediated by UTP, perhaps released by the bronchoalveolar epithelium in response to infection. This suggests that P2Y₂ receptor antagonists may be useful for the treatment of severe RSV broncheotitis.

Alveolar macrophages play a pivotal role in the development of chronic lung inflammatory reactions such as idiopathic pulmonary fibrosis, silicosis, asbestosis, hypersensitivity pneumonitis, sarcoidosis and mycobacterium tuberculosis. P2X₇ receptors are expressed in alveolar macrophages, which upon stimulation activate the proinflammatory IL-1 to IL-5 cytokine cascade and the formation of multinucleated giant cells, a hallmark of granulomatous reactions (15). P2X₇ receptors may be a relevant target for therapeutic intervention in lung hypersensitivity reactions associated with chronic inflammatory responses.

The need to support the failing lung (acute respiratory distress syndrome [ARDS]) with mechanical ventilation is potentially lifesaving, but unfortunately, alveolar overdistension and pulmonary shear stress may cause lung injury (ventilator-induced lung injury, VILI), increasing bronchoalveolar lavage leading to lung oedema. It has been suggested that VILI may involve stretch-associated release of ATP from neuroepithelial cell bodies (NEBs) and may therefore be a therapeutic target for this condition.

SPECIAL SENSES

Eye

Purinergic signalling is widespread in the eye and novel therapeutic strategies being developed for glaucoma, dry eye and retinal detachment (37).

ATP, acting via both P2X and P2Y receptors, modulates retinal neurotransmission, affecting retinal blood flow and intraocular pressure. The ATP analogue β,γ -methylene ATP is more effective in reducing intraocular pressure (40%) than muscarinic agonists such as pilocarpine (25%) and β -adrenoceptor blockers (30%), raising the potential for the use of purinergic agents in glaucoma. Suramin, a P2 receptor antagonist, has been shown to inhibit the fibrotic wound healing reactions that sometimes follow trabeculectomies for surgically treating eyes with glaucoma. Topical application of diadenosine tetraphosphate (Ap_4A) has been proposed for the lowering of intraocular pressure in glaucoma.

P2Y₂ receptor activation increases salt, water and mucus excretion, and thus represents a potential treatment for dry eye conditions (35). In the pigmented layer of the retina, P2Y₂ receptor activation promotes fluid absorption, and may be involved in retinal detachment. INS 37217, a long lasting synthetic P2Y₂ receptor agonist, stimulates the retinal pigment epithelium by activating P2Y₂ receptors at the apical membrane and *in vivo* treatment enhances the rate of subretinal fluid reabsorption in experimentally induced retinal detachments and may be useful for treating a variety of retinal diseases that result in fluid accumulation in the subretinal space. Reactive responses of Müller cells occur within 24 hours of retinal detachment. Suramin inhibits some of these responses and may provide a therapeutic candidate to limit the detrimental effects of immune cell activation and Müller cell gliosis during retinal detachment.

ATP and UTP restore the rates of both net Cl⁻ and fluid secretion in adenovirus type 5 infected conjunctival tissues and are considered as potential therapeutic modulators for the treatment of various transport defects encountered in ocular tissues in diseased and/or inflamed states.

UTP and diadenosine tetraphosphate (Ap_4A) accelerate wound healing in the rabbit cornea, by regulating the rate of epithelial cell migration.

The UPL rat is a dominant hereditary cataract model derived from Sprague-Dawley rats and has been used to show that Ca²⁺ ATPase expression increases, while ATP control decreases in lenses

during the development of the cataract and opacification; disulfiram and aminoguanidine, which inhibit inducible NO and scavenge reactive oxygen species, attenuate the decrease in ATP, resulting in a delay in cataract development.

Ear

In the auditory system ATP, acting via P2Y receptors, depresses sound-evoked gross compound action potentials in the auditory nerve and the distortion product otoacoustic emission, the latter being a measure of the active process of the outer hair cells (38). P2X splice variants are found on the endolymphatic surface of the cochlear endothelium, an area associated with sound transduction. Both P2X and P2Y receptors have been identified in the vestibular system. ATP may regulate fluid homeostasis, cochlear blood flow, hearing sensitivity and development, and thus may be useful in the treatment of Ménières disease, tinnitus and sensorineural deafness.

Excessive noise can irreversibly damage hair cell stereocilia leading to deafness. Data has been presented that release of ATP from damaged hair cells is required for Ca^{2+} wave propagation through the support cells of the organ of Corti, involving P2Y receptors, and this may constitute the fundamental mechanism to signal the occurrence of hair cell damage. ATP is claimed to mitigate the effects of noise trauma, although the primary mechanisms involved are not clear.

Nasal organ

Purinergic receptors have been described in the nasal mucosa, including the expression of P2X₃ receptors on olfactory neurones (39). Enhanced sensitivity to odours in the presence of P2 purinergic antagonists suggests that low-level endogenous ATP normally reduces odour responsiveness. It appears that the induction of heat-shock proteins by noxious odour damage can be prevented by the *in vivo* administration of P2 receptor antagonists. The predominantly suppressive effect of ATP in odour responses could play a role in the reduced odour sensitivity that occurs during acute exposure to noxious fumes and may be a novel neuroprotective mechanism.

UROGENITAL SYSTEM

In the normal human bladder, atropine will block at least 95% of parasympathetic nerve-mediated contraction, indicating that its innervation is predominantly cholinergic; purinergic signalling is responsible for the atropine-resistant component of contraction (40). There are a number of examples of the purinergic component of cotransmission increasing in pathological conditions. One is that purinergic nerve-mediated contraction of the human bladder is increased to 40% in pathophysiological conditions such as interstitial cystitis, outflow obstruction, idiopathic detrusor instability and probably also neurogenic bladder. ATP release from bladder epithelial cells from patients with interstitial cystitis is significantly greater than from healthy cells and there is increase of expression of P2X₂ and P2X₃ receptors in urothelial cells. P2X₁ receptor subtype expression markedly increased in obstructed bladder and in the absence of P2X₃ receptors in mouse knockouts, the bladder is hyperactive.

Purinergic signalling also plays a role in afferent sensation from the bladder. ATP is released from urothelial cells when the bladder is distended. Sensory-nerve recording has indicated that P2X₃ receptors are involved in mediating the nerve responses to bladder distension, providing mechanosensory feedback involving both the micturition reflex and pain (32). This, too, might be a potential target for pharmacological manipulation in the treatment of detrusor instability.

In ageing rats there is an increased sensitivity of the bladder to ATP, but no change in response to acetylcholine or potassium chloride. Comparable results have been found showing increased purinergic, but not cholinergic neurotransmission, to ageing human bladder smooth muscle. Activation of P2 receptors in the brain stem (both periaqueductal grey matter and Barrington's nucleus/locus ceruleus) generate patterns of activity in the parasympathetic innervation of the bladder. In patients with idiopathic detrusor instability, there is abnormal purinergic transmission in the bladder; this may account for some of the symptoms and provide a novel therapeutic target for treatment of overactive bladder (41). Voiding dysfunction involves P2X₃ receptors in awake chronic spinal cord injured rats, which raises the possibility that P2X₃ antagonists might

be useful for the treatment of neurogenic bladder dysfunction. Drugs that alter ATP release or breakdown might also be therapeutic targets. Expression of P2 receptors in bladder urethelium, as well as nerve and smooth muscle, changes in a cat model of interstitial cystitis and may be linked with painful bladder symptoms.

Normal penile erectile function is dependent upon a delicate balance between contracting and relaxing factors in the corpus cavernosum smooth muscle, which are modulated by signalling from both nerves and endothelial cells. Evidence has accumulated to support a pivotal role for non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitters. NO plays a central role in mediating cavernosal smooth muscle relaxation, but other neurotransmitters can modulate this action and may play a role in erectile dysfunction. ATP potently relaxes cavernosal smooth muscle strips *in vitro*, an action pharmacologically consistent with P2Y receptors. Indeed, P2Y receptors are present on both cavernosal smooth muscle cells and endothelial cells, and ATP is released from a subpopulation of the cavernosal nerves. It appears that smooth muscle relaxation is caused both by ATP acting directly on the cavernosal smooth muscle cells and indirectly, mediated by NO released from the endothelial cells. ATP-mediated cavernosal relaxation is impaired in diabetes mellitus (independent of NO) implying that purinergic signalling may be involved in the pathophysiology of erectile dysfunction.

In humans, ATP induces a significant increase in sperm fertilizing potential and this provides a rationale for the use of ATP for treatment of spermatozoa during *in vitro* fertilization. Knockout mice lacking P2X₁ receptors appear normal, but fail to breed and this is associated with loss of the purinergic component of sympathetic cotransmission in the vas deferens; these findings raise the possibility of developing non-hormonal ways of regulating male fertility. Differential, stage-dependent immunostaining for P2X receptors during spermatogenesis in the adult rat testes has been described (42) and opens up the possibility of purinergic targets for both fertility and contraception. Evidence has been presented that glycolysis has an unexpectedly important role in providing the ATP required for sperm motility throughout the length of the sperm flagellum.

The potential role of P2X₃ receptors in mechanosensory transduction has already been mentioned in relation to the bladder

(9). However, there is increasing evidence that this is not an isolated phenomenon and that ATP released from the epithelial lining of other organs such as the ureter, gut or bile duct following distension may act on P2X₃ receptors on afferent nerves in the subepithelial plexuses to provide sensory feedback and, in the case of the ureter, renal colic pain (**see section on Pain**). P2X₃ receptors have been found on the suburothelial nerve plexus and both the human and guinea-pig ureter have been shown to release ATP in a pressure-dependent fashion when distended. This ATP release is abolished when the urothelium is removed, and sensory nerve-recording studies during ureteral distension demonstrate purinergic involvement, suggesting that specific P2X₃ antagonists may have efficacy in alleviating renal colic.

Synergistic effects of ATP and oxytocin in increasing [Ca²⁺]_i in mouse mammary myoepithelial cells suggests that activation of purinergic receptors may facilitate myoepithelial cell contraction in the milk-ejection response. P2Y₂ receptors on apical and basolateral membranes appear to be involved.

Micromolar concentrations of ATP stimulate biphasic change in transepithelial conductance in the human uterine cervix, phase I mediated by the P2Y₂ receptor, phase II by the P2X₄ receptor. Given the potential role of ATP regulation of cervical paracellular permeability for human fertility, contraception and health, these findings may have clinical significance and may lead to the development of drugs that can target specific signalling pathways in the cervix.

FUTURE DEVELOPMENTS

Although in its infancy, the clinical manipulation of purinergic signalling has begun. Several clinically relevant pharmacological interventions are already part of day-to-day practice. However, one of the main reasons why we do not yet have more purinergic therapies in our formularies is the current sparsity of receptor-subtype-specific agonists and antagonists that are effective *in vivo*. In addition to the development of selective agonists and antagonists

from the different P2 receptor subtypes, therapeutic strategies are likely to include agents that control the expression of P2 receptors, inhibitors of extracellular breakdown of ATP and enhancers or inhibitors of ATP transport. Investigating the interactions of purinergic signalling with other established signalling systems will also be important.

REFERENCES

- (1) BURNSTOCK, G. AND KNIGHT, G. E. (2004): *Int. Rev. Cytol.* 240: 31-304.
- (2) RALEVIC, V. AND BURNSTOCK, G. (1998): *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- (3) BURNSTOCK, G. (2002): *Clinical Medicine* 2: 45-53.
- (4) AGTERESCH, H. J.; DAGNELIE, P. C.; VAN DER BERG, J. W. O. AND WILSON, J. H. (1999): *Drugs* 58: 211-232.
- (5) BURNSTOCK, G. (2002): *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22: 364-373.
- (6) YANG, A.; SONIN, D.; JONES, L.; BARRY, W. H. AND LIANG, B. T. (2004): *Am. J. Physiol* 287: H1096-H1103.
- (7) DI, V. F. AND SOLINI, A. (2002): *Br. J. Pharmacol.* 135:831-842.
- (8) GREIG, A. V. H.; LINGE, C.; TERENGI, G.; MCGROUTHER, D. A. AND BURNSTOCK, G. (2003): *J. Invest. Dermatol.* 120: 1007-1015.
- (9) BURNSTOCK, G. (2001): Purinergic signalling in gut. In Abbracchio, M. P. and Williams, M. editors. *Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 151/II. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling II-Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 141-238.
- (10) WYNN, G.; BEI, M.; RUAN, H-Z. AND BURNSTOCK, G. (2004): *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G647-G657.
- (11) GALLIGAN, J. J. (2004): *Br. J. Pharmacol.* 141: 1294-1302.
- (12) BURNSTOCK, G. (2001): *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 182-188.
- (13) DI VIRGILIO, F.; FALZONI, S.; MUTINI, C.; SANZ, J. M. AND CHIOZZI, P. (1998): *Drug Dev. Res.* 45: 207-213.
- (14) LAMMAS, D. A.; STOBER, C.; HARVEY, C. J.; KENDRICK, N.; PANCHALINGAM, S. AND KUMARARATNE, D. S. (1997): *Immunity.* 7: 433-444.
- (15) LEMAIRE, I. AND LEDUC, N. (2004): *Drug Dev. Res.* 59: 118-127.
- (16) WAEBER, C. AND MOSKOWITZ, M. A. (2003): *Neurology* 61: S9-20.
- (17) HOEBERTZ, A.; ARNETT, T. R. AND BURNSTOCK, G. (2003): *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 290-297.
- (18) KORCOK, J.; RAIMUNDO, L. N.; KE, H. Z.; SIMS, S. M. AND DIXON, S. J. (2004): *J. Bone Miner. Res.* 19: 642-651.
- (19) DELL'ANTONIO, G.; QUATTRINI, A.; CIN, E. D.; FULGENZI, A. AND FERRERO, M. E. (2002): *Arthritis Rheum* 46: 3378-3385.

- (20) RYTEN, M., YANG, S. Y., DUNN, P. M., GOLDSPIK, G., AND BURNSTOCK, G. (2004): *FASEB J.* 18: 1404-1406.
- (21) UNWIN, R. J., BAILEY, M. A., AND BURNSTOCK, G. (2003): *News Physiol. Sci.* 0 18: 237-241.
- (22) VONEND, O., TURNER, C., CHAN, C. M., LOESCH, A., DELL'ANNA, G. C., SRAI, S. K., BURNSTOCK, G., AND UNWIN, R. (2004): *Kidney Int.* 66: 157-166.
- (23) BURNSTOCK, G. (2003): Purinergic receptors in the nervous system. In Schwiebert, E. M., editor. *Current Topics in Membranes*, Vol. 54. *Purinergic Receptors and Signalling*, Academic Press, San Diego, pp. 307-368.
- (24) FUJII, S., KATO, H., AND KURODA, Y. (2002): *Neuroscience* 113: 617-628.
- (25) OGATA, T., CHUAI, M., MORINO, T., YAMAMOTO, H., NAKAMURA, Y., AND SCHUBERT, P. (2003): *Brain Res.* 981: 174-183.
- (26) TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M. W., AND INOUE, K. (2003): *Nature* 424: 778-783.
- (27) ABRAHAM, E. H., SALIKHOVA, A. Y., AND RAPAPORT, E. (2003): *Current Topics in Membranes* 54: 415-452.
- (28) CALVERT, R. C., SHABIR, M., BANKS, F., THOMPSON, C. S., MIKHAILIDIS, D. P., MORGAN, R., AND BURNSTOCK, G. (2004): *Anticancer Research* 24: 2853-2859.
- (29) WHITE, N., RYTEN, M., CLAYTON, E., BUTLER, P. AND BURNSTOCK, G. (2005): *Cancer Letters* (on-line).
- (30) GREIG, A. V. H., LINGE, C., HEALY, V., LIM, P., CLAYTON, E., RUSTIN, M. H., MCGROUTHER, D. A., AND BURNSTOCK, G. (2003): *J. Invest. Dermatol.* 121: 315-327.
- (31) BURNSTOCK, G. (1996): *Lancet* 347: 1604-1605.
- (32) VLASKOVSKA, M., KASAKOV, L., RONG, W., BODIN, P., BARDINI, M., COCKAYNE, D. A., FORD, A. P. D. W., AND BURNSTOCK, G. (2001): *J. Neurosci.* 21: 5670-5677.
- (33) RONG, W. AND BURNSTOCK, G. (2004): *Neuropharmacology* 47: 1093-1101.
- (34) MCGARAUGHTY, S., WISMER, C. T., ZHU, C. Z., MIKUSA, J., HONORE, P., CHU, K. L., LEE, C. H., FALTYNEK, C. R., AND JARVIS, M. F. (2003): *Br. J. Pharmacol.* 140: 1381-1388.
- (35) YERXA, B. R. (2001): *Drug Dev. Res.* 52: 196-201.
- (36) ADRIAENSEN, D. AND TIMMERMANS, J. P. (2004): *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 207-214.
- (37) PINTOR, J., PERAL, A., PELÁEZ, T., CARRACEDO, G., BAUTISTA, A., AND HOYLE, C. H. (2003). *Drug Dev. Res.* 59: 136-145.
- (38) SUETA, T., PAKI, B., EVERETT, A. W., AND ROBERTSON, D. (2003): *Hear. Res.* 183: 97-108.
- (39) GAYLE, S. AND BURNSTOCK, G. (2004): *Cell Tissue Res.* (on-line).
- (40) BURNSTOCK, G. (2001): Purinergic signalling in lower urinary tract. In Abbracchio, M. P. and Williams, M., editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 151/I. *Purinergic and Pyrimidinergetic Signalling I - Molecular, Nervous and Urinogenitary System Function*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 423-515.
- (41) ANDERSSON, K. E. AND HEDLUND, P. (2002): *Urology* 60: 13-20.
- (42) GLASS, R., BARDINI, M., ROBSON, T., AND BURNSTOCK, G. (2001): *Cells Tissues Org.* 169: 377-387.

History and future of poliovaccination, a personal account *

BART ROMBAUT

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

ABSTRACT

Immunization against poliomyelitis began in the fifties of the previous century, with the development of a formalin-inactivated poliovirus vaccine (IPV). Shortly later, a live attenuated oral poliovirus vaccine (OPV) was developed. It has been shown that both vaccines are very effective, but they achieve success in different ways.

The virus causing the disease, i.e. poliovirus, has been and is still the most extensively studied virus in the world. In the eighties of the previous century, the complete genomes of several poliovirus strains have been sequenced and the capsid structure has been elucidated at the atomic level.

These scientific break-throughs of modern molecular genetics and immunology have opened the way for the development for new or alternative vaccines. Consequently, different innovative approaches were undertaken to develop better vaccines, in order to improve the control of poliomyelitis. Some of these developments, such as the capsid stabilisation of the OPV and the use of subviral particles produced in yeast as an alternative vaccine, will be discussed.

The eradication programme of WHO will be discussed with an open mind to questions such as:

- (1) Is eradication possible?
- (2) Which vaccine should be used for the eradication?
- (3) Can we ever stop poliovaccination?
- (4) What is the impact of bioterrorism on poliovaccination policy?

Key words: Poliovirus.—Vaccination.—Eradication.—Vaccin.

* Discurso de Toma de Posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia pronunciado el día 17 de febrero de 2005.

RESUMEN

La inmunización contra la poliomielitis comienza en los años cincuenta del siglo pasado con el desarrollo de la vacuna de la polio inactivada (IPV). Inmediatamente después se desarrolló una vacuna oral polio trivalente (OPV). Se ha demostrado que ambas vacunas son muy efectivas, pero que alcanzan su objetivo de diferentes maneras.

El virus causante de la enfermedad, es decir, el virus de la polio, ha sido y sigue siendo el virus más extensamente estudiado en el mundo. En los años ochenta del siglo anterior se logró secuenciar el genoma completo de varios tipos del virus de la polio, así como la elucidación a nivel atómico de la estructura de su cápside.

Los avances científicos en genética molecular moderna e inmunología han abierto el camino para el desarrollo de nuevas o alternativas vacunas. Una de las consecuencias es el desarrollo de técnicas innovadoras para la creación de vacunas más perfeccionadas con el fin de mejorar el control sobre la poliomielitis. Algunos de estos desarrollos van a ser discutidos como, por ejemplo, la estabilización de la cápside en la OPV o el uso como vacuna alternativa de partículas subvirales producidas en levaduras.

El programa de erradicación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) va a ser discutido, prestando una especial atención a preguntas como las siguientes:

- ¿Es posible la erradicación?
- ¿Qué vacuna debería usarse para la erradicación?
- ¿Podremos parar algún día la vacunación contra la polio?
- ¿Cuál es el impacto del bioterrorismo en la política de vacunación de la polio?

Palabras clave: Virus de la polio.—Vacunación.—Erradicación.—Vacuna.

RESUMEN EXTENSO

Vacunación contra la polio, historia y futuro

La poliomielitis es una enfermedad de las células espinales nerviosas causada por una infección del virus de la polio y que puede causar parálisis. La enfermedad puede atacar a personas no inmunes de cualquier edad, pero afecta principalmente a niños menores de tres años. Es una enfermedad de transmisión fecal-oral, el virus se introduce en el organismo a través de la boca y se reproduce en el interior de la garganta e intestinos. En algunos casos (un caso de cada 200 a 1.000 infecciones) el virus penetra en el torrente sanguíneo e invade el sistema nervioso central. Cuando se multiplica, el virus destruye las células nerviosas (neuronas motoras) que activan los músculos. Los músculos de las piernas son afectados en mayor medida que los músculos de los brazos. Los miembros se vuelven débiles y sin vida —condición conocida como parálisis flácida aguda—. Una parálisis más extendida, incluyendo los músculos del tórax y del abdomen, puede conducir a quadriplegía. En los casos más severos, el virus de la polio ataca las neuronas

motoras del tronco cerebral reduciendo la capacidad para respirar y causando dificultades para la deglución y el habla. Sin una asistencia técnica respiratoria adecuada, la polio puede causar la muerte.

El virus de la polio que causa la poliomiелitis pertenece a la familia de las Picornaviridae. El genoma del virus de la polio consiste en una molécula de cadena sencilla positiva de RNA que puede ser traducida directamente en un único y gigante polipéptido que tiene que seguir una serie de divisiones postsintéticas sucesivas para constituir proteínas funcionales. El virus de la polio tiene tres tipos distintos de serotipos.

La polio no es una enfermedad nueva. En realidad es conocida desde hace más de 3.000 años. Varios ejemplos testifican de la presencia de casos ocasionales de la poliomiелitis durante la historia de la humanidad. Pero la enfermedad no aparece a menudo de forma epidémica. La poliomiелitis ha sido durante muchos años una enfermedad ocasional de los niños, que pasó a denominarse parálisis infantil —y esta característica se mantiene aún en algunas comunidades con medidas sanitarias primitivas, donde la enfermedad es endémica—. No fue hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX que la poliomiелitis se convirtió en una amenaza para la salud humana y llegaron las primeras epidemias de poliomiелitis. Aquí describimos detalladamente los factores responsables de este cambio en el comportamiento epidemiológico de la poliomiелitis. Aunque difícil de creer: el factor principal conductor de epidemias de poliomiелitis es paradójicamente la mejora en la sanidad y en la higiene.

En el año 1952 se detectan 58.000 casos de polio en los Estados Unidos, la mayor cantidad jamás alcanzada. En el continente europeo, una estimación de 28.500 niños eran paralizados anualmente por la poliomiелitis. ¡La «histeria de la polio» es un hecho! ¡En esa época, todos los avances terapéuticos usando medicamentos no tuvieron éxito! (y esto se mantuvo durante más de cuarenta años). Al final, se comprobó que el único método útil para parar la amenaza de la poliomiелitis sería la creación de una vacuna eficiente. La primera vacuna desarrollada en 1955 por el doctor Jonas Salk fue la vacuna de la polio inactivada (IPV). La vacuna contiene virus neurovirulentos procedentes de tres tipos distintos (o tres tipos de serotipos). La IPV ha de ser inyectada y funciona produciendo anticuerpos protectores en la sangre, previniendo de esa manera la dispersión del virus de la polio a través del sistema nervioso central. Sin embargo, provoca solamente niveles muy bajos del virus de la polio en el intestino. Como resultado, provee una protección individual contra la parálisis de la polio, pero no puede prevenir la dispersión del virus de la polio salvaje. Pocos años después de la creación de la IPV, se dispone de una vacuna oral contra la poliomiелitis (OPV). Esta vacuna fue desarrollada por el doctor Albert Sabin. La OPV se toma por vía oral. Esta vacuna contiene virus atenuados o debilitados a partir de tres distintos serotipos. La OPV tiene dos acciones diferenciadas: la OPV provoca anticuerpos en la sangre. De nuevo, esto protegerá al individuo contra la parálisis de la polio evitando la dispersión del virus de la polio al sistema central. Pero la OPV produce también una respuesta local inmune en la membrana mucosa de los intestinos (que es en realidad el lugar primario de la reproducción del virus de la polio). Los anticuerpos limitan la reproducción del virus «salvaje» o «virus neurovirulento» en el interior del intes-

tino, evitando una infección efectiva. Las ventajas y desventajas de ambas vacunas son discutidas en detalle.

Debido a las campañas masivas de inmunización con IPV llevadas a cabo durante la segunda mitad de los años cincuenta del siglo xx en los Estados Unidos y en Europa (y más tarde con la OPV), la incidencia de la poliomielitis en ambas zonas ha disminuido de manera drástica. En los años setenta la poliomielitis no representa ya una amenaza para los países desarrollados. Los años ochenta fueron otra época dorada para la investigación sobre el virus de la polio. Se logró la secuenciación de los genomas completos de varios tipos de virus de la polio, así como la elucidación de la estructura de la cápsida a nivel atómico. Durante ese tiempo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), decidió erradicar la polio del mundo. Sin embargo, hubo ciertas dudas sobre la eficacia de la OPV para la erradicación de la poliomielitis. Uno de los problemas principales con la OPV es su termolabilidad. Se necesita una «cadena fría» para transportar la vacuna hasta las personas a las que va destinada. Gracias a nuevos avances científicos en la investigación del virus de la polio, varias vacunas alternativas se desarrollaron en los años ochenta y principios de los noventa. Sin embargo, ninguna de estas vacunas alcanzó el nivel de producción. Algunas de ellas van a ser discutidas aquí.

Ahora la erradicación del virus de la polio se acerca a su fin, e incluso la OMS espera que se cese la inmunización contra la polio en un futuro próximo. Pero, ¿es esto realizable? ¿Y qué sucede con el terrorismo biológico? Como arma terrorista, el virus de la polio es casi ideal: es altamente contagioso, fácil de distribuir en la alimentación y reservas de agua, y es virtualmente imposible de detectar hasta que el mal ha hecho ya su efecto.

WHAT IS POLIOMYELITIS?

Poliomyelitis is a crippling disease of spinal nerve cells caused by a poliovirus infection. The disease can strike non-immune persons of any age, but affects mainly children under the age of three, and causes paralysis in one case of every 200 to 1,000 infections. It is a faecal-oral transmitted disease, the virus enters humans orally and then multiplies inside the throat and intestines. The incubation period is 4-35 days and the initial symptoms include fever, fatigue, headache, vomiting, constipation, stiffness in the neck, and pain in the limbs. Once established, poliovirus can enter the bloodstream and invade the central nervous system, spreading along the nerve fibres.

As it multiplies, the virus destroys the nerve cells (motor neurons) that activate muscles. These nerve cells cannot be regenerated and

the affected muscles no longer function. The muscles of the legs are affected more than the arm muscles. The limb becomes floppy and lifeless – a condition known as acute flaccid paralysis. More extensive paralysis, involving muscles of the thorax and abdomen, can result in quadriplegia. In the most severe cases, poliovirus attacks the motor neurons of the brain stem – reducing breathing capacity and causing difficulty in swallowing and speaking. Without respiratory support, polio can result in death (1, 2).

POLIOVIRUS

Poliovirus causing poliomyelitis is the type species of the Picornaviridae, a close-knit group of viruses of man and other vertebrates, with small (30nm), unenveloped, spherical virions. The genome consists of one molecule of single-stranded RNA. The RNA is of a positive polarity, meaning that is ready to act as a messenger RNA. The hallmarks of the picornaviruses are the single translation unit, which occupies up to 90% of their RNA and the resulting synthesis of a single, giant polypeptide which has to undergo a cascade of postsynthetic cleavages to functional proteins.

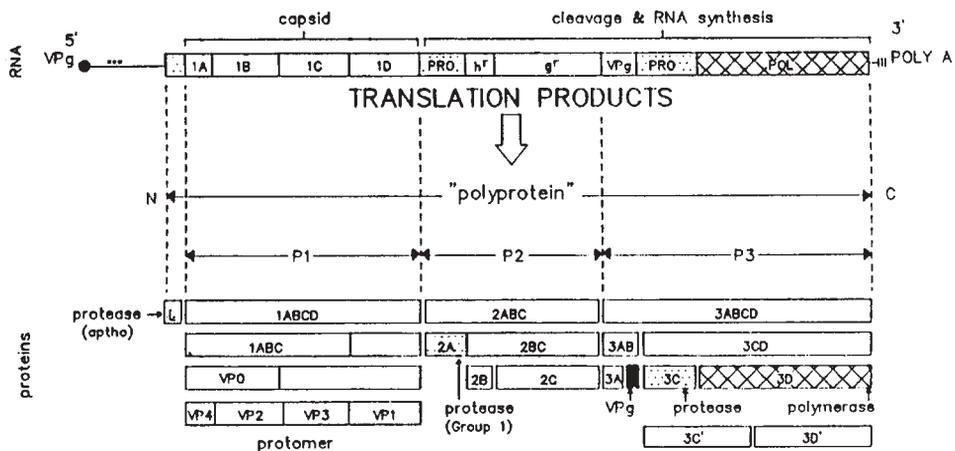


FIGURE 1. *The poliovirus RNA, translation and postsynthetic cleavage (from Rueckert, 1985, with permission).*

The ultimate cleavage products are the four structural proteins (called VP1-4) destined to build the protein capsids of the virions plus half a dozen nonstructural proteins, several which are known to possess enzymatic activities (3).

Poliovirus has three different serotypes and is belonging to the enterovirus genus, one of the six genera of the picornavirus family (4).

HISTORY OF POLIOLMYELITIS

Polio is not a new disease! Poliomyelitis is in fact known for more than 3,000 years. An Egyptian limestone stele (1350 B.C.) exhibited in the Glyptotek Museum in Copenhagen portrays the priest Rem giving offerings to the Goddess Astarte. The man has a thin, withered leg, widely believed have been caused by poliomyelitis. The ancient Greeks were also cognisant of the disease, for instance Hippocrates described paralysis that afflicted patients predominantly in summer and autumn, i.e., the period that has been considered as the «polio season» (6). In archaeological excavations in southern Greenland, 24 skeletons from the 15th century were discovered, which showed bone deformities reminiscent of those typically associated with severe poliomyelitis. These examples ascertain that occasional cases of poliomyelitis have occurred throughout the history of mankind. On the other hand, the scarcity of the reports indicates that the manifestations of poliomyelitis were rare, and that the disease did not often occur in an epidemic form (7).

The epidemiological picture of the disease changed dramatically in the late 19th and, early 20th centuries. The first epidemics occurred in Northern Europe and the U.S.A. These epidemics grew in size, frequency, and severity. In 1889, the first recorded poliomyelitis epidemic has been experienced in Stockholm (Sweden), afflicting 44 persons. By 1916, no fewer than 27,000 cases of poliomyelitis have been recorded in the U.S.A. alone. During the first 3 decades of the 20th century, 80-90% of poliomyelitis victims were under 5 years of age, with the majority of patients afflicted during the first 2 years of life. Therefore, the disease was often termed «infantile paralysis». It became as dreaded as the plagues of the middle ages. In areas which had suffered repeated epidemics, a shift in the age of

incidence occurred, with more children, teenagers and young adults becoming affected (7).

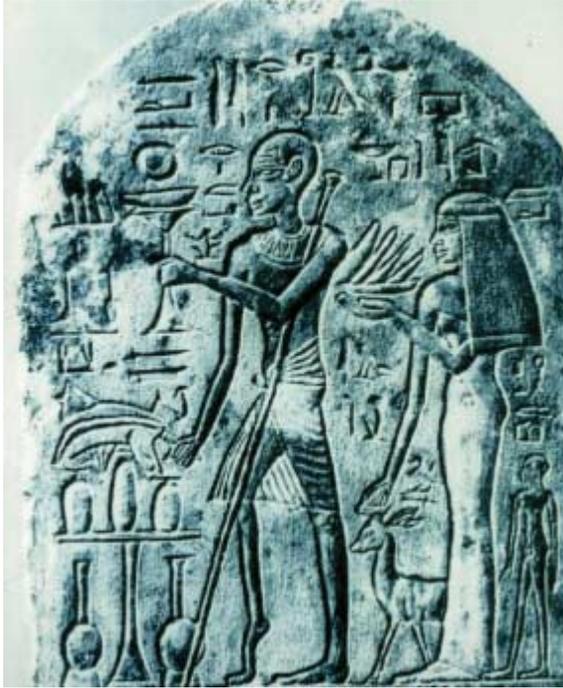


FIGURE 2. *Poliomyelitis*, shown on stele for Ruma (or Rem), Egypt, at sanctuary of goddess Astarte at Memphis c. 2000 BC. Major, 43 (with credit to the WHO: <http://www.polioeradication.org/features/photos/photogallery.asp>).

The epidemiological picture of the disease changed dramatically in the late 19th and, early 20th centuries. The first epidemics occurred in Northern Europe and the U.S.A. These epidemics grew in size, frequency, and severity. In 1889, the first recorded poliomyelitis epidemic has been experienced in Stockholm (Sweden), afflicting 44 persons. By 1916, no fewer than 27,000 cases of poliomyelitis have been recorded in the U.S.A. alone. During the first 3 decades of the 20th century, 80-90% of poliomyelitis victims were under 5 years of age, with the majority of patients afflicted during the first 2 years of life. Therefore, the disease was often termed «infantile paralysis». It became as dreaded as the plagues of the middle ages. In areas

which had suffered repeated epidemics, a shift in the age of incidence occurred, with more children, teenagers and young adults becoming affected (7).



FIGURE. 3. *Polio patients in iron lungs (with credit to the WHO: <http://www.polioeradication.org/features/photos/photogallery.asp>).*

Meanwhile, the Austrian physicians Karl Landsteiner and Erwin Poppen, made the first hypothesis that poliomyelitis might be caused by a virus. After the second World War, large epidemics occurred all over the world. In 1952, there are 58,000 cases of polio in the U.S.A., the most ever. In the European Region, an estimated 28,500 children were annually paralysed by poliomyelitis. «Polio hysteria» is a fact (2).

THE EMERGENCE OF POLIOEPIDEMICS

As described previously, poliomyelitis was for many years primarily an occasional disease of infants and this pattern is still seen today in communities with primitive sanitation, where the

disease is endemic. It was only by the end of the 19th century and the beginning of the 20th century that poliomyelitis became a threat to human health, and the first polioepidemics occurred.

What are the factors underlying this change in epidemiologic behaviour of poliomyelitis? The main factor inducing polioepidemics is paradoxically the improvement of sanitation and hygiene.

Poliovirus is in fact not so highly neurotropic as has been supposed. The infection is primarily an inapparent one, involving the alimentary tract and consequently poliomyelitis is actually a relatively uncommon complication (poliomyelitis causes paralysis in one case of every 200 to 1,000 infections). The shedding of the virus from the throat and intestinal tract by asymptomatic persons (clinically unrecognised cases) serves as the main source of spread of the infection, and explains why a history of contact between patients is usually lacking. Dissemination of the virus is facilitated by crowding and poor standards of hygiene and sanitation (example: tropical developing countries). Under these conditions, there is a continuous circulation of the virus, immunizing infections early in childhood are universal, sporadic paralytic cases are confined to the youngest age group and consequently there are no epidemics. The disease remains endemic, which has been the case for at least 3,000 years.

In contrast (and before vaccination became possible), in countries with high standards of hygiene and sanitation, and practically always with high socioeconomic levels, circulation of the virus was intermittent and children were protected from exposure early in life. As a consequence, large numbers of susceptible individuals built up, and when virulent strains were introduced in a community, this resulted in progressively more devastating epidemics that involved increasingly older age groups. Moreover, there is a clear evidence for a higher frequency of paralytic disease when infections occur in susceptible older children and young adults (paralytic disease in one case of every 75 infections) as compared with young children (paralytic disease in one case of every 1,000 infections). Also this fact substantially contributed to the emergence of severe outbreaks and epidemics (8).

Although, it is now clear why polioepidemics occurred so late in history, there are still a lot of questions to answer: (1) what are the

factors involved in limiting the infection to a systemic, inapparent one, primarily involving the oropharynx and the intestinal tract; (2) what interactions spell progression to disease of the central nervous system and paralysis; and (3) why is there a difference in frequency of paralytic disease when infection occurs between younger and older children?

THE AGE OF VACCINATION

In 1916, the worst polioepidemic known in history was spreading throughout the U.S.A., afflicting more than 27,000 persons with a fatal progress in 6,000 cases, in New York alone. Little was known at this time about the pathogenicity of poliomyelitis. This 1916 U.S.A. epidemic gave great impetus to polio research, particularly in the U.S.A. Additional psychological backing for polio research came from an episode, which started in 1921, when the great Franklin D. Roosevelt contracted poliomyelitis. Roosevelt supported all measures that had hope of leading to a healing or prevention of the disease. Yet even in the twenties and thirties of the 20th century, promising results from polio research were very meager. The early therapeutic approaches using drugs were the cause of much frustration. This in contrast to the enormous success in the therapy of bacterial infections with antibiotics, following the discovery of penicillin by A. Flemming in 1928. Many drugs or chemicals were tested in the laboratories, none proved to be of any therapeutic value. Finally, it became clear that the only hopeful method to conquer the threat of poliomyelitis would be the development of an efficient vaccine (7). However, one has to realise that vaccinology was even in the mid fifties of the 20th century a very young discipline, and that at that time the knowledge on poliovirus and poliomyelitis was mainly clinical.

One of the main problems in developing a vaccine against poliomyelitis was the necessity to have a susceptible tissue, in which sufficiently large quantities of virus could be grown. At the end of the fourties of the 20th century, a landmark in the development of a vaccine came when Enders, Weller and Robbins (9) showed that poliovirus could be isolated and readily propagated in cell cultures of non-neuronal human or monkey tissue.

Another break-through was the result of a collaborative effort of many investigators (Committee on Typing of National Foundation of Infantile paralysis, 1951). This study showed that polioviruses belong to only three distinct serological types (type 1 to 3).

Due to this new knowledge on poliovirus and poliovirus replication, the fifties (of the 20th century) evolved into the golden age of poliovaccin development. Two different kinds of vaccine became available. Describing the detailed history of the development of both vaccines could be the subject of another topic. Therefore, only the vaccines will be described, together with their advantages and disadvantages.

The first vaccine developed in 1955 by Dr. Jonas Salk (10, 11), was a formalin inactivated (killed) poliovaccine (IPV). The vaccine contains neurovirulent virus from three different strains (of three different serotypes), originally grown on primary cells of monkeys. After sufficient growth, the virus is concentrated, purified and inactivated with formaldehyde. Each dose of vaccine contains 40 D antigen units of type 1, eight D antigen units of type 2 and 32 D antigen units of type 3. Trace amounts of antibiotics are also found in the vaccines (neomycin, streptomycin, etc.). Some manufacturers use 2-phenoxyethanol as a preservative (12).

IPV needs to be injected and works by producing protective antibodies in the blood (serum immunity) – thus, in fact, preventing the spread of poliovirus to the central nervous system. However, it induces only very limited levels of poliovirus inside the gut. As a result, it provides individual protection against polio paralysis but, unlike OPV, cannot prevent the spread of wild poliovirus.

There are several advantages of using IPV: (1) IPV is not a «live» vaccine, consequently IPV carries no risk of vaccine-associated polio paralysis, (2) it is more heat stable than OPV, and (3) immunization with IPV triggers an excellent response of the immune system in most IPV recipients.

TABLE 1. *Advantages and disadvantages of IPV and OPV*

Advantage	Disadvantage
IPV	
— killed→ no mutation	— parenteral administration
— heat-stable	— expensive
— no vaccine-associated infections	— inactivation-procedure
	— no intestinal immunity
OPV	
— cheap	— mutation!
— oral administration	— heat labile
— humoral and intestinal immunity	— virus shedding
	— vaccine-associated infections

There are also some disadvantages in using IPV: (1) unlike OPV, IPV confers only very little immunity in the intestinal tract. Consequently, in a person vaccinated with IPV, virulent virus can still multiply inside the intestines and can be shed in stools. Hereby risking continued circulation, (2) IPV is expensive. A higher dosis of antigen is required (compared to OPV). There is the cost of the syringe and moreover the need for trained health workers to administer the vaccine using sterile procedures (13).

A few years after IPV, a live attenuated (weakened) oral polio vaccine (OPV) became available. This vaccine was developed by Dr. Albert Sabin. OPV is given orally (14, 15). This vaccine contains attenuated or weakened virus from three different serotypes (the so-called Sabin strains). This non-neurovirulent virus was also originally grown on primary monkey kidney cells and after growth, the virus is concentrated (and less purified than the IPV). The live virus of three serotypes is then blended as follows: 10^6 TCID₅₀ for type 1, 10^5 TCID₅₀ for type 2 and $10^{5.7}$ TCID₅₀ for type 3. Each dose of OPV contains residual amounts of antibiotics. Because OPV is very thermolabile, stabilisers are added. This can be sucrose or MgCl₂ (16).

The action of OPV is two-pronged : OPV induces antibodies in the blood (serum immunity). Again, this will protect the individual against polio paralysis by preventing the spread of poliovirus to the

nervous system. But, OPV also produces a local immune response in the mucous membrane of the intestines (which is in fact the primary site for poliovirus multiplication). The antibodies limit the multiplication of «wild» or «neurovirulent» virus inside the gut, preventing effective infection. This intestinal immune response to OPV is probably the main reason why mass campaigns with OPV can rapidly stop person-to-person transmission of wild virus.

What are the main advantages of OPV? (1) OPV is a cheap vaccine. This is due to the fact that it is an orally applicable vaccine. It can be given by volunteers (see National Vaccination Days) and—unlike most other vaccines— does not require sterile injection equipment. (2) The short-term shedding of vaccine virus in the stools of recently immunized children, means that in areas where hygiene and sanitation are poor—and the incidence of poliovirus is likely to be high— immunization with OPV can result in the «passive» immunization of persons with close contact. As discussed above, the unique ability of OPV to induce intestinal immunity is probably responsible for the extraordinary effect of OPV mass campaigns interrupting wild poliovirus transmission.

OPV has also some disadvantages: (1) although OPV is safe and effective, it can induce poliovirus paralysis, the so-called vaccine-associated infection in approximately 1 in every 2.5 million doses.

THE CONTROL OF POLIOMYELITIS

Due to mass immunization campaigns with IPV in the second half of the fifties of the 20th century in the U.S.A. and in Europe, the incidence of poliomyelitis in both regions dropped dramatically. In 1962, IPV is replaced by OPV in much countries. OPV is shown to be superior in terms of ease of administration, but also provides longer-lasting immunization. Using OPV, several countries appear to interrupt transmission of poliovirus after introducing OPV. But also in countries where IPV is used, such as Sweden, Finland and the Netherlands, the potential of IPV for controlling poliomyelitis is amply illustrated. By the 1970s poliomyelitis is no longer a threat in most developed countries (1, 8).

THE GOLDEN AGE OF POLIOVIRUS RESEARCH

The 1980s were another golden decade for poliovirus research. The complete genomes of several poliovirus strains have been sequenced (17, 18) and the capsid structure has been elucidated at the atomic level (19). By preparing escape mutants, selected by murine monoclonal antibodies, the four neutralising antigenic sites of poliovirus could be identified (20, 21). These neutralizing antigenic sites provoke antibodies in man, protecting us against the disease. It was found that these neutralising sites were also present on subviral particles (22), and that these subviral particles could be the active principle of alternative, new vaccines (23). These particles could even be cloned in a *Saccharomyces cerevisiae* inducible expression system and empty capsids purified from this expression system were shown to have the same immunogenicity as poliovirus virions (24, 25). However, none of these alternative vaccines has been further developed.

THE GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE

In may 1988, at its annual meeting in Geneva, the World Health Assembly, the governing body of the World Health Organization (WHO), resolved to eradicate polio from the world. After smallpox, poliomyelitis would be the next disease to be targeted for global eradication. The global eradication of polio has two components: (i) halting the incidence of the disease and (ii) the worldwide eradication of poliovirus. There is only a limited number of diseases that can be eradicated. Most diseases can only be controlled. The rationale for polio eradication is:

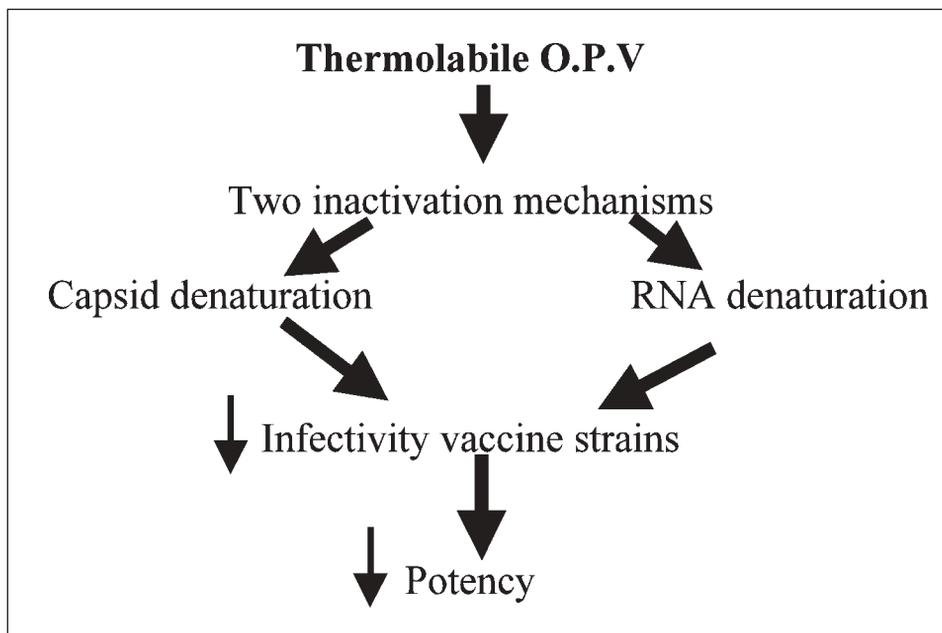
- (1) polio only affects humans, and there is no animal reservoir
- (2) an effective, inexpensive vaccine exists (OPV)
- (3) immunity is life-long, and
- (4) the virus can only survive for a very short time in the environment.

The polio eradication strategy is based on the premise that poliovirus will die out when it is deprived of its human host through

immunization. The strategy is similar to that used for smallpox eradication in 1977.

The strategy developed by WHO and its partners (Rotary, UNICEF) to eradicate polio has 4 components:

- (1) High routine infant immunization with OPV. OPV is one of the six antigens provided by the national routine immunization programme during the first year of life. Routine coverage of at least 90% with three doses of OPV is the foundation for establishing the level of population immunity needed to eradicate polio.
- (2) Supplemental mass immunization (National Immunization days). In order to ensure that all children have been adequately immunized with OPV and interrupt the circulation of wild poliovirus, it is necessary to conduct supplemental immunization campaigns.
- (3) Epidemiological and laboratory surveillance for Acute Flaccid Paralysis. A sensitive surveillance system for acute flaccid paralysis is necessary to identify paths of continuing transmission of wild poliovirus and to provide evidence to allow for the certification of polio-free status and subsequent cessation of immunization.
- (4) «Mopping-up» immunization. «Mopping-up» immunization activities are most important in the later stages of the eradication effort, when areas that are at high risk based on continued circulation of the wild poliovirus, can be targeted. During this phase, OPV is administered in a house-to-house campaign (2).

TABLE 2. *Inactivation mechanisms of thermolabile OPV*

One of the main problems with OPV (already discussed in a previous section) is its thermolability. OPV is the least thermostable vaccine of the six antigens provided by the nationale routine immunization. A «cold chain» is required to bring the vaccine to the vaccinees. This «cold chain» might be a problem to realize in developing tropical and subtropical countries. The final step of the eradication of poliovirus, the «mopping-up» component will be more difficult to realize if the vaccine must be strictly maintained within narrow temperature limits. Therefore, WHO prepared in 1989 a request for proposals in order to enhance the thermostability of OPV. Research as an answer to this request, revealed that the thermolability of the vaccine is due to two different inactivation mechanisms: (i) denaturation of the viral capsid and, (ii) degradation of the viral RNA within the capsid (26, 27) and that chemical tools are available to stabilize both mechanisms (27, 28). However, a few years later, WHO decided to abandon all work on new or improved vaccines. After the succes of eradication polio in the Americas, WHO made the decision to globally eradicate poliovirus with OPV.

IS POLIOMYELITIS ERADICATION FEASIBLE?

In the original Global Polio Eradication Initiative (document of WHO) from 1988, poliomyelitis should be eradicated by the year 2000. However, this date was too optimistic. Since the creation of the Global Polio Eradication Initiative, the global toll of polio paralysis dropped from an estimated 350,000 (per year) to fewer than 1,000 in 2004. The Americas had their last case of polio in 1991, they were certified polio-free in 1994. In 2000, the Western Pacific Region, including China, was declared polio-free. The European region, including parts of the former Soviet Union, is on track to be certified in 2002. The world awaits the end of polio in just 10 countries in Africa and South Asia (29). In other words: the «polio endgame» is going on. Global certification of polio eradication is now scheduled for the year 2005.

TABLE 3. *Polio eradication: quick facts*

-
- There are 20 million polio survivors worldwide, including one million in the U.S.
 - Five million children have been prevented from contracting polio since the effort began.
 - Polio will be only the second disease ever to be eradicated by mankind.
 - The world has reduced polio by a staggering 99%. But it's the last 1% that's the hardest to overcome – that is what our film focuses on.
 - In 1988, there were 350,000 new cases of polio a year. In 2004, there were 1,000.
 - If polio returns to the pre-eradication level, 1,000 new cases a day could appear.
 - The global polio eradication effort is the largest public health initiative in history.
 - Many health workers and volunteers risk their lives to immunize children.
 - The cost of the oral polio vaccine (OPV) is \$0.11 per dose.
-

An important question to answer is: Will it be possible to cease immunization? The ultimate benefits of polio eradication, including the estimated global savings of • 1.5 billion annually, will be gained only after the cessation of polio immunization. Before polio immunizations can be stopped, all laboratory polioviruses must be destroyed or transferred to maximum biosafety containment facilities.

The WHO plan to cease immunization is based on the model used to fight smallpox. Unfortunately, the two viruses differ

dramatically in both biology and history. The vaccinia virus, used in the smallpox vaccine is not directly derived from a wild virus. There is no way it can mutate back into a pathogenic form and cause an outbreak. OPV, on the other hand, contains three attenuated viruses and can reverse into a wild-type virus. OPV can induce vaccine-associated infections (discussed earlier). That is the reason that as of January 1, 2000, IPV is exclusively used in the U.S.A. for routine childhood poliovaccination. This decision was taken to eliminate the risk for vaccine-associated paralytic poliomyelitis. However, using IPV is also a problem: IPV would not provide the same type of immunity as OPV; individuals vaccinated in this way would still be able to act as carriers (no gut immunity). So, if we are willing to cease vaccination, only a combination of an IPV/OPV protocol would be advisable in the «polio endgame».

However, is cessation of immunization a good idea? What about biological terrorism? As a terrorist weapon, poliovirus is nearly ideal: it is highly contagious, easily released into food and water supplies, and virtually impossible to detect until the damage has already been done.

REFERENCES

- (1) <http://www.who.dk/polio>.
- (2) <http://www-nt.who.int/vaccines/polioeradication>.
- (3) BOEYÉ, A. & ROMBAUT, B. (1992): *Progr. Med. Virol.* 39: 139-166.
- (4) VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTEN, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R. & WICKNER, R. B., eds. (2000): *Virus taxonomy: 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, 1024 pp.
- (5) ORENT, W. (2000): *Sciences - New York* 40: 23-31.
- (6) ARMSTRONG, C. (1950): *J. Pub. Health* 40: 1296-1304.
- (7) KOCH, F. & KOCH, G., eds. (1985): *The molecular biology of poliovirus*. Springer-Verlag, Wien - New York, 590 pp.
- (8) HORSTMANN, D. M. (1982): *J. Infect. Dis.* 146: 540-551.
- (9) ENDERS, J. F.; WELLER, T. H. & ROBBINS, F. C. (1949): *Science* 109: 85-87.
- (10) SALK, J. E. (1953): *Am. J. Pub. Health* 43: 1384-1398.
- (11) SALK, J. E.; KRECH, U.; YOUNGER, J. S.; BENNETT, B. L.; LEWIS, J. L. & BAZELEY, P. L. (1954): *Am. J. Pub. Health* 44: 563.

- (12) PLOTKIN, S. A.; MURDIN, A. & VIDOR, E. (1999). In: Plotkin, S. A. & Orenstein, W. A., eds. *Vaccines* (3rd ed.), Philadelphia PA, WB Saunders Company, pp. 345-363.
- (13) <http://www.nt.who.int/vaccines/polioeradication/all/background/vaccines>.
- (14) SABIN, A. B. (1955): *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 61: 924-938.
- (15) KOPROWSKI, H.; NORTON, T. W.; JERVIS, G. A., NELSON, T. L., et al. (1956): *JAMA* 160: 954-966.
- (16) SUTTER, R. W.; COCHI, S. L. & MELNICK, J. L. (1999): In: Plotkin, S. A. & Orenstein, W. A., eds. *Vaccines* (3rd ed.), Philadelphia PA, WB Saunders Company, pp. 364-408.
- (17) KITAMURA, N.; SEMLER, B. L.; ROTHBERG, P. G.; LARSEN, G. R.; ADLER, C. J.; DORNER, A. J.; EMINI, E. A.; HANECAK, R.; LEE, J. J.; VAN DER WERF, S.; ANDERSON, C. W. & WIMMER, E. (1981): *Nature* 291: 547-553.
- (18) TOYODA, H.; KOHARA, M.; KATAOKA, Y.; SUGANUMA, T.; OMATA, T.; IMURA, N. & NOMOTO, A. (1984): *J. Mol. Biol.* 174: 561-585.
- (19) HOGLE, J. M.; CHOW, M. & FILMAN, D. J. (1985): *Science* 229: 1358-1365.
- (20) PAGE, G. S.; MOSSER, A. G.; HOGLE, J. M.; FILMAN, D.; RUECKERT, R. R. & CHOW, M. (1988): *J. Virol.* 62: 1781-1794.
- (21) MINOR, P. D. (1990): *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 161: 121-154.
- (22) ROMBAUT, B.; VRIJSEN, R. & BOEYÉ, A. (1990): *Virology* 174: 305-307.
- (23) ROMBAUT, B.; BRIOEN, P. & BOEYÉ, A. (1990): *J. Gen. Virol.* 71: 1081-1086.
- (24) JORE, J. P. M.; VELDHIJSEN, G.; POWELS, P. H.; BOEYÉ, A.; VRIJSEN, R. & ROMBAUT, R. (1991): *J. Gen. Virol.* 72: 2721-2726.
- (25) ROMBAUT, B. & JORE, J. P. M. (1997): *J. Gen. Virol.* 78: 1829-1832.
- (26) ROMBAUT, B.; VERHEYDEN, B.; ANDRIES, K. & BOEYÉ, A. (1994): *J. Virol.* 68: 6454-6457.
- (27) VERHEYDEN, B.; ANDRIES, K. & ROMBAUT, B. (2001): *Vaccine* 19: 1899-1905.
- (28) ROMBAUT, B.; ANDRIES, K. & BOEYÉ, A. (1996): In: Brown, F., ed. *New approaches to stabilization of vaccines potency. Developments in biological standardization*, vol. 87, *Basel, Karger*, pp. 173-180.
- (29) <http://www.endofpolio.org>.

Nuevos antitumorales de origen marino*

JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia*

RESUMEN

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, su explotación desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado, conociéndose en la actualidad únicamente unos 11.000 productos naturales de origen marino frente a más de 155.000 terrestres. En este discurso se hace una breve revisión general de los principales compuestos antitumorales de origen marino, estudiándose después con mayor detalle los grupos de las piridoacridinas y las triprostatinas. Se hace también una breve revisión de los mecanismos de la acción antitumoral de estos compuestos, entre los que pueden mencionarse los siguientes: inhibición de la angiogénesis, inducción de apoptosis, interrupción del ciclo celular en diversas fases, fragmentación del ADN a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, inhibición de enzimas relacionadas con el ADN (topoisomeras, polimerasas, factores de transcripción), interacción con tubulina y microtúbulos y despolarización de la membrana de los lisosomas. Finalmente, se revisan algunas rutas sintéticas hacia dos grupos de productos naturales de origen marino, las piridoacridinas y las triprostatinas.

Palabras clave: Antitumorales.—Compuestos marinos.—Piridoacridinas.—Triprostatinas.—Síntesis orgánica.

ABSTRACT

Although oceans cover about 70% of the Earth's surface and contain most of the biosphere, they are almost unexplored regarding the search for new chemical

* Versión resumida del discurso de toma de posesión como Académico Correspondiente, pronunciado el 7 de octubre de 2004 en la Real Academia Nacional de Farmacia.

entities. Thus, only about 11,000 marine natural products are known, in contrast to more than 155,000 terrestrial compounds. In this talk, after a schematic review of the main marine antitumour compounds and their mechanisms of action, the pyridoacridines and tryprostatins are discussed in more detail. The mechanisms of antitumour activity are also briefly reviewed including angiogenesis inhibition, apoptosis induction, interruption of the cell cycle at several stages, DNA fragmentation through the generation of reactive oxygen species, inhibition of DNA-related enzymes (topoisomerases, polymerases, transcription factors), interaction with tubulin and microtubules and lysosome membrane depolarization. Finally, some routes for the synthesis of the pyridoacridines and the tryprostatins are discussed.

Key words: Antitumour compounds.—Marine compounds.—Pyridoacridines.—Tryprostatins.—Organic synthesis.

EXTENDED SUMMARY

New marine antitumour compounds

Although oceans cover about 70% of the Earth's surface and contain most of the biosphere, they are almost unexplored regarding the search for new chemical entities. Thus, only about 11,000 marine natural products are known, in contrast to more than 155,000 terrestrial compounds.

About 70% of the marine organisms that have yielded natural products belong to five *phyla*, namely *Porifera*, *Mollusca*, *Cnidaria*, *Echinodermata* and *Tunicata*. They are normally very primitive organisms that use bioactive secondary metabolites as an environmental adaptation mechanism and, because they often inhabit unique ecological niches, can be expected to produce structurally unique compounds, among which ecteinascidin-743 (trabectedin), aplidin, bryostatin, the dolastatins, kahalalide F and discodermolide, are currently undergoing clinical evaluation. Their mechanisms of action are very varied, and include angiogenesis inhibition, apoptosis induction, interruption of the cell cycle at several stages, DNA fragmentation through the generation of reactive oxygen species, inhibition of DNA-related enzymes (topoisomerases, polymerases, transcription factors), interaction with tubulin and microtubules and lysosome membrane depolarization.

Pyridoacridines are a group of strongly coloured, polycyclic alkaloids isolated from marine organisms, with potent cytotoxic activities. Their mechanism of action is not completely understood, although topoisomerase II inhibition, apoptosis induction and oxygen radical generation have been proved to take place in the case of ascididemin. Pyridoacridines are obtained in tiny amounts from their natural sources because they are not easily accesible and also because they produce very low concentrations of the alkaloids. This has stimulated their preparation by total synthesis, and strategies based on the use of hetero Diels-Alder, Suzuki and Friedländer reactions as the key steps are discussed. Finally, a route is described for the total synthesis of tryprostatin B, a cell cycle inhibitor isolated from a marine fungal strain, based on the tandem prenylation-cyclization of a 2,5-piperazinedione precursor followed by rearrangement of the prenyl chain.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, de manera que una de cada tres personas se verá afectada por esta enfermedad y entre un 20 y un 25% fallecerá por su causa. A diferencia de lo que sucede en otros campos terapéuticos, la quimioterapia del cáncer está dominada por los productos naturales, que suponen más del 60% de los fármacos utilizados con este fin. En este contexto, comentaré a continuación algunos de los avances realizados en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales en fuentes de origen marino.

Como es bien sabido, el océano cubre el 70% de la superficie del planeta y la biodiversidad en su seno es muy superior a la existente en la tierra, estimándose que contiene alrededor del 95% de la biosfera. Pese a ello, los océanos están todavía casi inexplorados desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos, y actualmente se conocen solamente unos 11.000 compuestos marinos frente a unos 155.000 de origen terrestre. Estos productos naturales de origen marino poseen con frecuencia estructuras y mecanismos de acción biológica sumamente originales, que los hacen sumamente interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos (1).

Si se examina una distribución de los productos naturales marinos en función de la taxonomía de los organismos de los que proceden (2), se observa que aproximadamente un 70% del total corresponde a cinco grupos: esponjas, celentéreos, moluscos, tunicados y equinodermos. Se trata de organismos primitivos, poseedores de sistemas inmunitarios muy rudimentarios, que con frecuencia viven inmóviles y que habitan nichos ecológicos muy poblados. La evolución de estos organismos se ha dirigido hacia la producción de sustancias químicas con las que interactúan con su entorno, incluyendo compuestos citotóxicos para defenderse de sus predadores o de infecciones, por lo que pueden constituir una fuente muy importante de nuevos antitumorales (3).

Algunos productos del metabolismo secundario de estos organismos marinos han alcanzado la fase clínica de su desarrollo (4). Entre ellos, mencionaremos en primer lugar la briostatina, aislada por

primera vez a partir del briozoo *Bugula neritina*. Su primer ensayo clínico se llevó a cabo por el National Cancer Institute de Estados Unidos (NCI), siendo necesario recolectar 13 toneladas de organismo y utilizar técnicas cromatográficas a gran escala para obtener 18 g de compuesto para este estudio clínico inicial. Actualmente se encuentra en fase II, y también ha servido de modelo para la preparación de numerosos análogos de síntesis.

De la babosa marina *Dolabella auricularia* se han aislado numerosos péptidos bioactivos, incluyendo el antitumoral dolastatina 10. Aunque en los ensayos de fase II este compuesto demostró una actividad insuficiente frente a varios tumores, ha servido de modelo para la preparación de numerosos análogos de síntesis. Destacaremos la auristatina PE, que se diferencia del modelo en la ausencia del anillo de tiazol señalado en la figura 1, y que se encuentra actualmente en fase II.

El primer compuesto marino que se ensayó en clínica fue la didemnina, aislada por el grupo de Rinehart en la universidad de Illinois a partir del tunicado *Trididemnum solidum* (5). Resultó demasiado tóxica, lo que se ha atribuido posteriormente al empleo de dosificaciones inadecuadas, por lo que fue abandonada. No obstante, el desarrollo de este compuesto sentó las bases para la puesta a punto de métodos de cultivo y extracción a gran escala que han resultado esenciales para el desarrollo de otros fármacos marinos (6). Actualmente ha sido reemplazada por la aplidina, de la empresa española PharmaMar, que aunque es estructuralmente muy similar a ella, resulta menos tóxica y se encuentra actualmente en fase II. Otro compuesto procedente de la colaboración entre Rinehart y PharmaMar (7) es la ecteinascidina 743 o trabectedina, que se encuentra en fase III y será con toda probabilidad el primer compuesto de origen marino en alcanzar el mercado (figura 3). Procede del tunicado *Ecteinascidia turbinata* y se obtuvo inicialmente por extracción a partir de este organismo, obtenido por técnicas de maricultura, pero en la actualidad se obtiene por semi-síntesis a partir de un metabolito de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, la cianosafracina (8).

La halicondrina B se aisló inicialmente de la esponja *Halichondra okadai*, y después se encontró en otras, siendo necesaria una tone-

lada de una de ellas (*Lyssodendoryx sp.*) para obtener 300 mg de compuesto. Actualmente ha sido reemplazado por un análogo de síntesis, que está en Fase I, en el que se ha sustituido el grupo lactona por una cetona para aumentar su estabilidad. A pesar de la

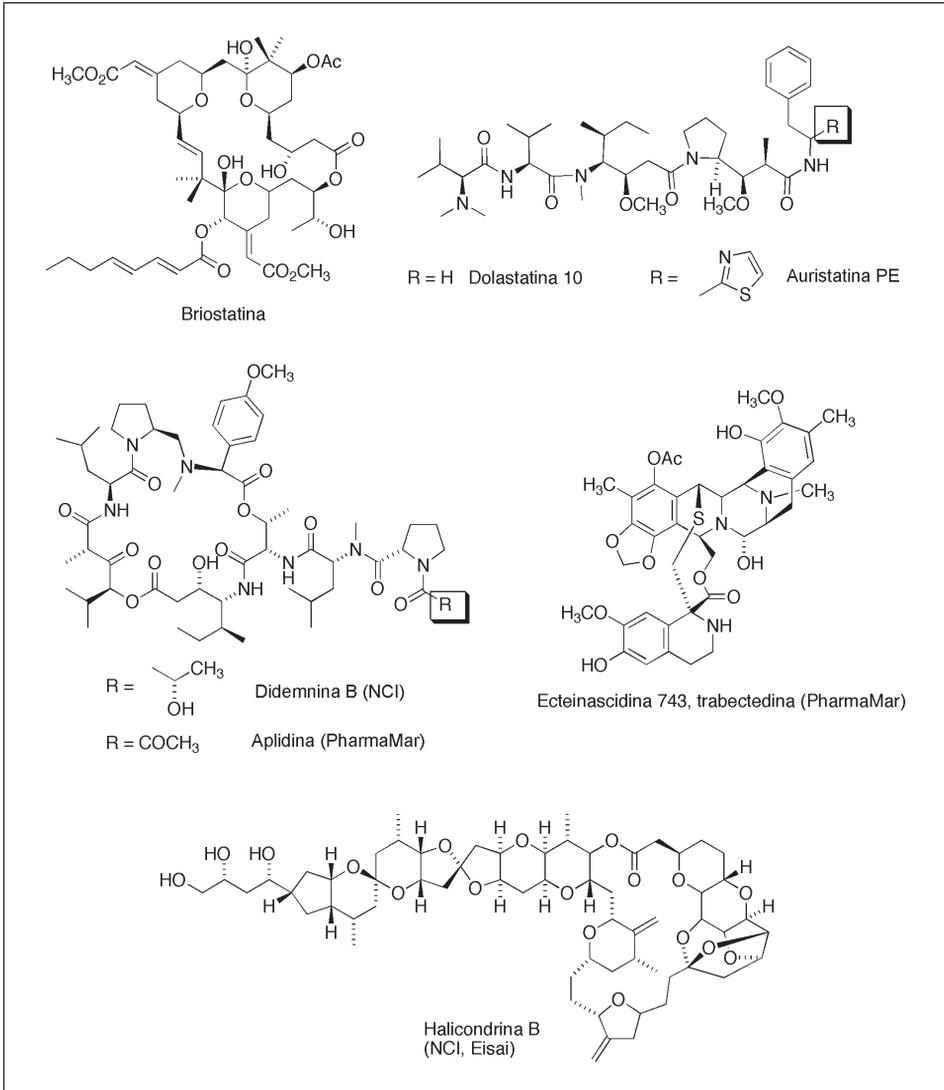


FIGURA 1. Estructuras de la briostatina, dolastatina 10, auristatina PE, didemnina B, ecteinascidina 743 y halicondrina B.

complejidad de este compuesto, el material necesario para los ensayos clínicos se obtiene en la compañía Eisai por síntesis total, utilizando metodología desarrollada por Kishi, lo cual es una prueba del enorme avance de la síntesis orgánica moderna.

La Kahalalida A, un desipéptido cíclico, es producida por algas del género *Bryopsis*, aunque en cantidades muy pequeñas (5 mg a partir de 3 kg de alga). Una fuente más adecuada es la babosa marina *Elysia rufescens*, que se alimenta del alga y concentra el compuesto (2,1 g a partir de 216 g de babosa). Este compuesto se encuentra en fase II para la indicación de cáncer de próstata.

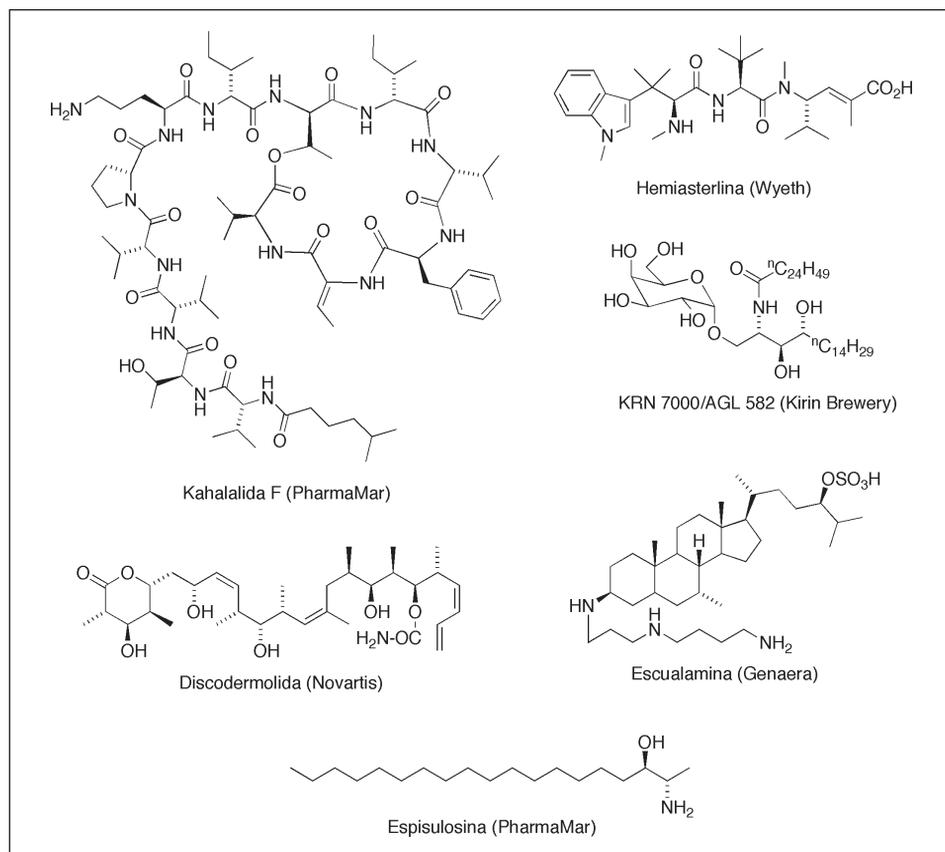


FIGURA 2. Estructuras de la kahalalida A y otros antitumorales de origen marino que se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico..

Varios productos procedentes de esponjas se encuentran en fase I, como la discodermolida (de *Discodermia dissoluta*), que, pese a su complejidad, se puede obtener a escala de kilogramos por síntesis total, la hemiasterlina (de *Hemiasterella minor*) y el heterósido conocido como KRN 7000 (de *Agelas sp.*). También es interesante la escualamina, el único compuesto de los mencionados aquí que procede de un vertebrado, el tiburón *Squalus acanthias*. Este esteroide se encuentra actualmente en fase II contra tumores sólidos y, a causa de su efecto inhibidor de la angiogénesis, se está investigando también para otros fines, como el tratamiento de la neovascularización que acompaña a la degeneración macular asociada con la edad.

La espisulosina, un aminoalcohol altamente lipófilo procedente de la almeja antártica *Spisula polynimia* (*Mactromeris polynyma*), está siendo desarrollada por PharmaMar como antitumoral.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE ANTITUMORALES MARINOS

Los mecanismos de la acción antitumoral de estos y otros compuestos de origen marino son demasiado complejos para intentar un comentario completo (9). Mencionaremos entre ellos, los siguientes:

- a) Inhibición del proceso de angiogénesis (desarrollo de nuevos vasos sanguíneos), que es esencial para el crecimiento y propagación de los tumores.
- b) Inducción del proceso de muerte celular programada, o apoptosis, a través de diversos mecanismos.
- c) Inhibición de diversas proteínas específicamente destinadas a regular el ciclo celular, como las quinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK), las quinasas de "checkpoint" (Chk) y las fosfatasa de especificidad dual.
- d) Las topoisomerasas son otro grupo de enzimas que actúan sobre el ADN, rompiendo una o las dos hebras y volviéndolas a unir tras un giro. Algunos inhibidores, como la sansalvamiida A, actúan inhibiendo la etapa de fijación de la topoisomerasa al ADN. Sin embargo, el mecanismo más habitual de inhibición, característico de compuestos con estructuras pla-

nas que puedan actuar como agentes intercalantes, consiste en la formación de un complejo ternario estable ADN-topoisomerasa-inhibidor, que impide la actuación de la enzima. Este es el modo de acción sobre las topoisomerasas de las pirroloiminoquinonas, piridoacridinas y lamelarinas (10).

- e) Los microtúbulos son los principales componentes del esqueleto celular y están formados por la agregación de heterodímeros de una proteína llamada tubulina, donde existen sitios de unión de algunos antitumorales de uso en terapéutica, como el paclitaxel y los alcaloides de vinca. Son una de las dianas más habituales de antitumorales de origen marino, entre los que pueden destacarse la dolastatina, que se une al sitio de vinca y la discodermolida, en fase I, cuya unión es más potente que la del taxol y probablemente ocurre en el mismo sitio. También son interesantes la halicondrina B, que inhibe la despolimerización de la tubulina por unión a un sitio próximo (pero diferente) al de vinca y la eleuterobina, que se une al sitio del taxol y que ha sido objeto de interesantes estudios de química combinatoria por el grupo de Nicolau.
- f) El ADN es otra de las dianas de antitumorales marinos. Algunos de ellos contienen subestructuras de quinonimina, como las pirroloiminoquinonas y las piridoacridinas (11, 12), lo cual permite que actúen promoviendo la formación de especies reactivas de oxígeno, como se indica en la figura 3.a. La ecteinascidina 743 puede considerarse un agente alquilante del ADN, con el que forma enlaces covalentes, aunque se diferencia de otros agentes alquilantes en que se une de forma específica al surco menor. Esta unión deforma la molécula del ADN, lo cual, unido al efecto estérico debido al fragmento C de la molécula, impide la actuación correcta de diversas enzimas que deben unirse al ADN, fundamentalmente TC-NER (*Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair*) y NF-Y, un factor de transcripción. Desde el punto de vista químico, la unión covalente de la ecteinascidina al ADN se debe a la presencia de una estructura de tipo hemiaminal, que genera un catión iminio con el que reacciona el grupo amino de la posición 2 de una unidad de guanina (figura 3.b).

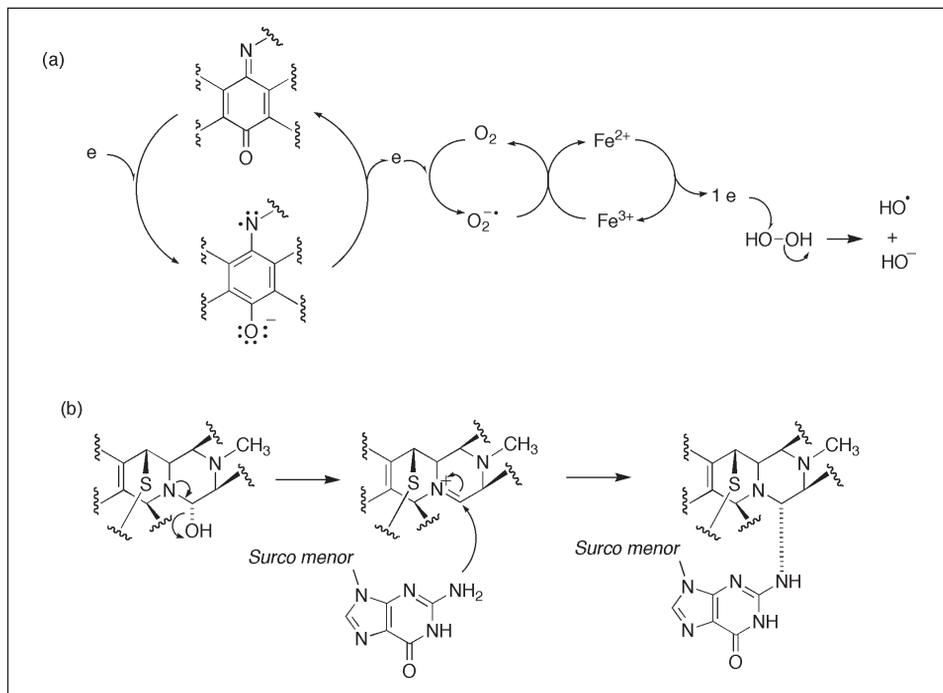


FIGURA 3: (a) Mecanismo de generación de especies reactivas oxigenadas por algunos compuestos de origen marino. (b) Mecanismo de acción de la ecteinascidina 743

EL GRUPO DE LAS PIRIDOACRIDINAS

Una característica común de los organismos marinos mencionados es la de poseer con frecuencia coloraciones muy intensas, que se deben a la presencia de diversas sustancias colorantes, con frecuencia con estructuras heterocíclicas. Entre ellas, destacaremos los compuestos conocidos como piridoacridinas, ya mencionados, que se caracterizan por la presencia de un fragmento de pirido[2,3,4-*kl*]acridina (13). Puede considerarse que hay tres tipos estructurales de piridoacridinas, de los que son ejemplos la anfimedina y la neoanfimedina (aisladas de las esponjas *Amphimedon compressa* y *Xestospongia sp.*, respectivamente), que presentan un anillo adicional fusionado a la cara *h*, la ascididemina (aislada de los tunicados

Didemnum sp. y *Cystodytes dellechiaiei*) y las kuanoniaminas (aislada del tunicado *Didemnum chartacium* y la esponja *Oceanapia sp.*), con un anillo adicional fusionado a la cara *i*, y la eudistona B y la eilatina (ambas aisladas del tunicado *Eudistoma sp.*), con las dos caras ocupadas por anillos adicionales (figura 4).

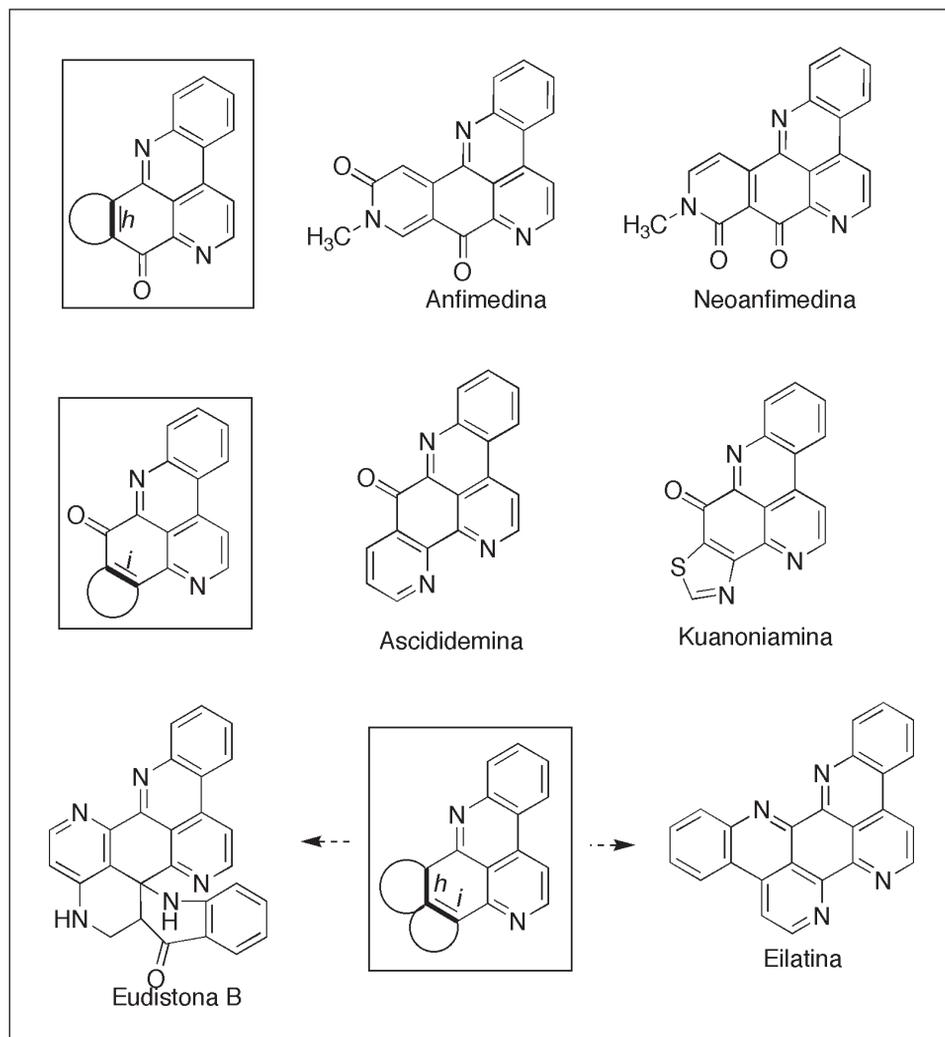


FIGURA 4. *Pyridoacridinas representativas.*

La mayor parte de las piridoacridinas poseen una potente actividad citotóxica, que se traduce en propiedades antitumorales, antifúngicas y antiparasitarias, entre otras. Debe resaltarse, no obstante, que generalmente son compuestos de muy baja solubilidad, lo que hace que sean inadecuados como fármacos tal y como se aíslan de la naturaleza. Los mecanismos implicados en su actuación son complejos y no del todo conocidos, habiéndose estudiado especialmente en el caso de la ascididemia. En primer lugar, la presencia de un fragmento estructural de quinonimina conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno, capaces de fragmentar el ADN (14). Este efecto está reforzado por el carácter quelante de la ascididemia, que se debe a la presencia de un fragmento estructural de 9,10-fenantrolina y que permite su asociación con cationes metálicos capaces de catalizar la transformación del radical superóxido en hidroxilo. Por otra parte, la estructura plana de la ascididemia hace que se comporte como un agente intercalante (15), lo que guarda relación con su capacidad de inhibir la topoisomerasa II (16). Por último, se ha demostrado recientemente la capacidad de la ascididemia de inducir el fenómeno de apoptosis (16, 17) (figura 14). A medida que avanza la investigación sobre las piridoacridinas se van descubriendo otros mecanismos, como por ejemplo la propiedad de la neoanfimedina de inducir a la topoisomerasa a encadenar entre sí moléculas diferentes de ADN (18).

Existen varias razones por las que resulta interesante el estudio de rutas de síntesis hacia las piridoacridinas. En primer lugar, se puede considerar que la estructura de estos compuestos sólo se conoce con seguridad cuando se ha confirmado por síntesis total. Esta era una situación habitual en la química de productos naturales antes del desarrollo de las técnicas de RMN, pero muy rara en la actualidad. Sin embargo, en el campo de las piridoacridinas se han dado asignaciones estructurales erróneas (19), que se pueden atribuir en parte a su baja solubilidad, que impide la realización de ciertos experimentos de RMN, y en parte a la presencia en sus estructuras de muy pocos hidrógenos y muchos carbonos cuaternarios, lo que hace a veces difícil interpretar los experimentos de correlación heteronuclear.

Un segundo factor que hace interesante la síntesis de las piridoacridinas es su escasez, ya que sus fuentes naturales son poco

accesibles y proporcionan cantidades diminutas de compuesto. Esto hace imposible realizar estudios biológicos más allá de los ensayos preliminares; por citar un ejemplo, para aislar 21 mg de 11-hidroxiacrididemina se necesitaron 11 kg de *Amphicarpa meridiana* (20). Finalmente, el desarrollo de rutas sintéticas debe permitir la preparación de análogos en los que se mejoren las propiedades de las piridoacridinas naturales. En este sentido, debe destacarse que la baja solubilidad de las piridoacridinas las hace inadecuadas para su uso como fármacos, por lo que es esencial disponer de métodos de síntesis de análogos mejorados. En este contexto, voy a comentar a continuación algunos de los proyectos en este campo en que he estado involucrado en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense, junto a la profesora Avendaño y un elevado número de colaboradores, y que se basan en el desarrollo de las estrategias retrosintéticas que se resumen en la figura 5.

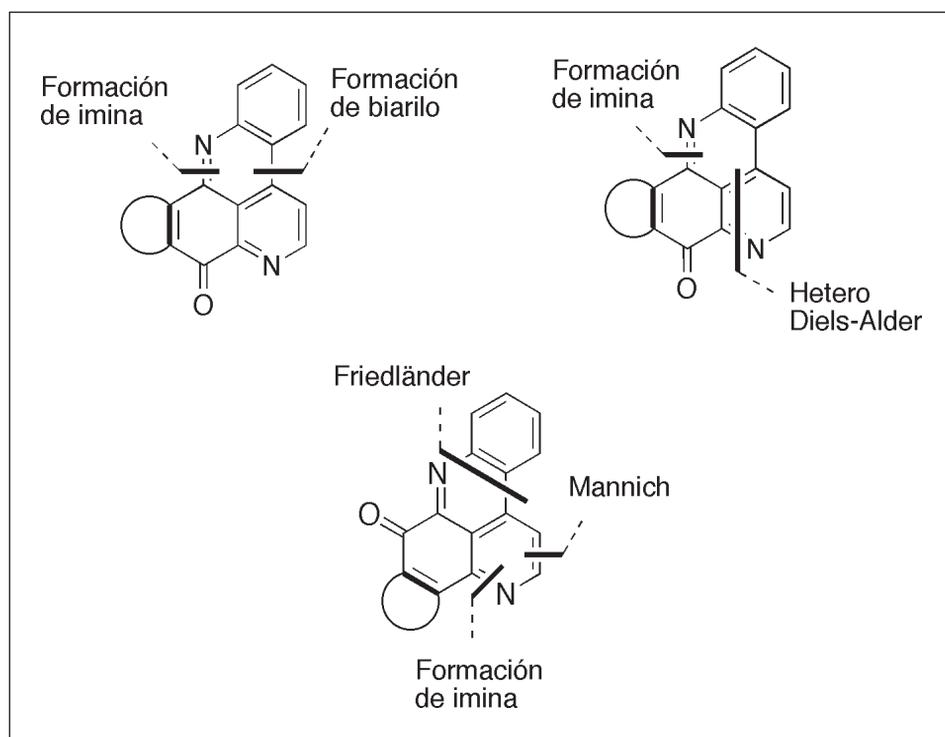


FIGURA 5. Estrategias para la síntesis de sistemas de piridoacridina.

La primera de las estrategias tiene como etapa clave la formación de un sistema de biarilo, una transformación que presenta considerables dificultades a pesar de su aparente sencillez. Los mejores métodos se basan en el empleo de especies organometálicas, y entre ellos pueden destacarse los que implican el uso de catalizadores de paladio. Una de ellas es la reacción de Stille, en la que se consigue la formación de un enlace carbono-carbono a partir de un triflato de arilo y un arilestannano. Esta reacción fue una de las etapas clave de la primera síntesis total de un derivado de piridoacridina, la anfimecina (21). También es de gran importancia la reacción de Suzuki, en la que se unen un ácido arilborónico y un haluro de arilo. Como ejemplo de las estrategias basadas en la formación de sistemas de biarilo, se muestra en la figura 6 la preparación del sistema no sustituido de pirido[2,3,4-*kl*]acridina **6.7**, que era de interés para estudiar su actividad antitumoral y como intermedio de síntesis. El enlace arilo-arilo se creó por medio de una reacción de Suzuki, aunque no había sido aplicada previamente a 4-haloquinolinas, debido a que la de Stille había dado malos resultados en un sustrato

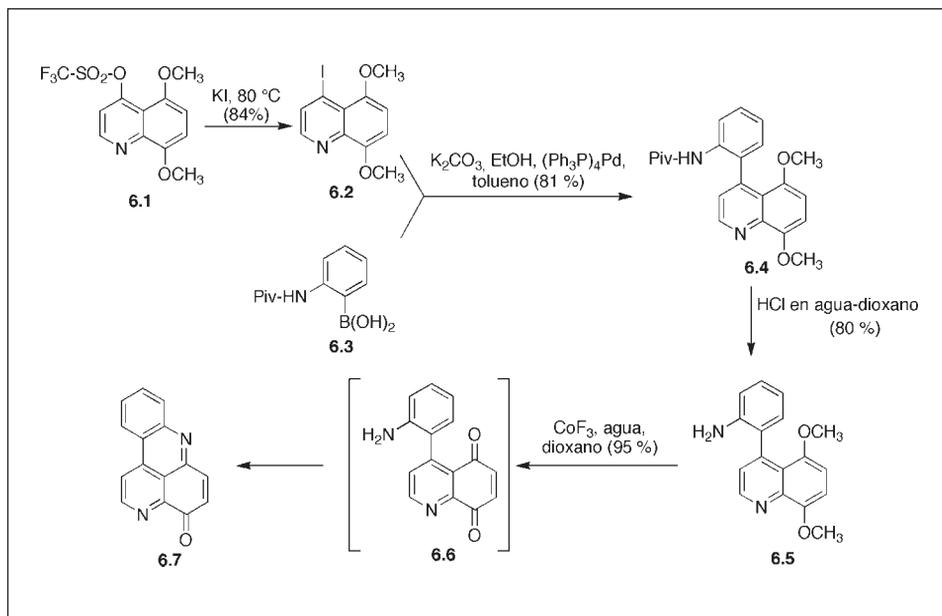


FIGURA 6. Síntesis del sistema no sustituido de pirido[2,3,4-*kl*]acridina.

similar (22). El derivado de 4-yodoquinolina **6.2**, preparado a partir del correspondiente triflato **6.1** (21), se hizo reaccionar con el ácido borónico **6.3** en presencia del complejo $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ para dar **6.4**. Tras una etapa de desprotección se obtuvo el compuesto **6.5**, cuya desmetilación oxidativa en presencia de fluoruro de cobalto dio lugar a **6.6**, no aislado, que se transformó espontáneamente en **6.7** (23). La elección del fluoruro de cobalto como agente oxidante fue clave para el éxito de la síntesis, ya que la presencia de un grupo amino en **6.5** aumenta la densidad electrónica del anillo aromático al que está unido y por tanto su facilidad para la oxidación, por lo que el empleo de agentes más convencionales, como por ejemplo el nitrato cérico amónico, condujo a mezclas muy complejas.

La segunda estrategia de síntesis se basa en el empleo de reacciones de tipo hetero Diels-Alder. Como se observa en la figura 5, la desconexión de este tipo conduce a una quinona y a un 1-azadieno, en el que es necesaria la presencia de un grupo donador electrónico (dimetilamino, normalmente) para compensar el efecto aceptor del doble enlace $\text{C}=\text{N}$. Un problema que plantea el uso de 1-dimetilamino-1-azadienos es la posibilidad de liberación de dimetilamina al medio, lo que puede dar lugar a reacciones no deseadas. Existen varios procedimientos que permiten minimizar estos problemas, algunos desarrollados en nuestro laboratorio. Uno de ellos es el uso de resinas de poliestireno electrófilas, que forman un derivado covalente con la dimetilamina (24). Aunque este procedimiento mejoró la mayor parte de las reacciones ensayadas, no fue adecuado para el caso de los 4-aril-1-dimetilamino-1-azadienos necesarios para la preparación de piridoacridinas ya que, a causa de su baja reactividad, fue necesario el empleo de condiciones de reflujo, en las cuales el producto de reacción se une covalentemente a la resina. Otros procedimientos ensayados, como la realización de las reacciones sobre un soporte de gel de sílice, que retiene la dimetilamina gracias a su acidez (25), y la sustitución del sustituyente dimetilamino por otros que no liberan especies nucleófilas, como los grupos acetilamino (26) y tosilamino, fueron también inadecuados para los 4-aril-1-dimetilamino-1-azadienos, aunque resultaron de interés para otros proyectos (27). El único método que permitió mejorar los resultados de la reacción de Diels-Alder de este tipo de azadienos, ya descrito por otros autores, consistió en el empleo de una corriente de gas

inerte para arrastrar la dimetilamina formada durante la reacción. En estas condiciones, el azadieno **7.1** reaccionó con la quinona **7.2** para dar el compuesto **7.3** con rendimiento aceptable. La síntesis se completó por aromatización a **7.4** en presencia de carbono-paladio y ciclación hidrolítica a **7.5** (28) (figura 7). Este compuesto se puede considerar como un regioisómero de la anfimedina y la neoanfimedina, y ha mostrado una excelente actividad *in vitro* frente a algunos tumores sólidos (29). Su principal limitación radica en una baja solubilidad en todos los medios, que impide su correcta evaluación *in vivo*, aunque actualmente estamos preparando una serie de análogos destinados a resolver este problema.

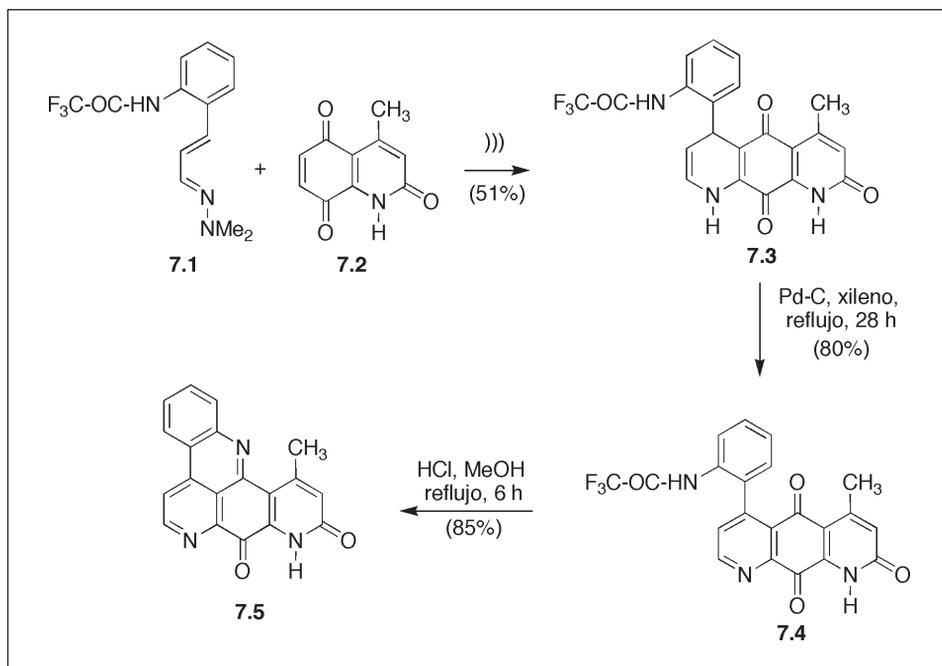


FIGURA 7. Síntesis de un regioisómero de anfimedina y neoanfimedina a través de una reacción hetero Diels-Alder

Como se deduce de la figura 7 y de otros casos similares, la reacción entre 1-azadienos y quinolinaquinonas conduce de forma mayoritaria o exclusiva a derivados de 1,8-diazaantraquinona. Debido a que existen productos naturales con fragmentos de 1,5-diazaan-

traquinona, sería interesante disponer de un método para invertir la regioselectividad de la reacción, y la solución más general a ese problema ha sido la introducción de un halógeno en la posición 6 de la quinolina (30). Cuando se aplica a la preparación de sistemas de piridoacridina, este método tiene el inconveniente de que impide la utilización del azadieno **7.1** porque resultan mezclas complejas, probablemente debido a la hidrólisis del grupo trifluoroacetamido de **7.1** por el bromuro de hidrógeno liberado a partir del aducto de Diels-Alder. Una solución a este problema puede consistir en reemplazar el grupo trifluoroacetamido por un grupo nitro, que no es sensible a la hidrólisis pero tiene el inconveniente de que, a causa de su efecto fuertemente aceptor, hace disminuir la ya escasa reactividad de los 4-arilazadienos, por lo que es necesario encontrar algún método para acelerar la reacción de Diels-Alder. Fracasó el procedimiento más habitual, consistente en el empleo de ácidos de Lewis como catalizadores, porque en su presencia la reacción se desvía hacia la producción de derivados de furo[2,3-*f*]quinolina (26). Por este motivo, aunque apenas existían antecedentes de su empleo en reacciones de Diels-Alder, decidimos estudiar el efecto de la irradiación ultrasónica sobre nuestras reacciones porque los efectos químicos de los ultrasonidos se deben a la generación local de altas temperaturas y presiones como consecuencia del fenómeno de cavitación, y es bien conocido que las reacciones de Diels-Alder se aceleran por efecto de presiones muy elevadas. Después de un estudio inicial que demostró una considerable aceleración de las reacciones de 1-dimetilamino-1-azadienos sencillos con una amplia serie de dienófilos en condiciones de irradiación ultrasónica (31), aplicamos esta técnica a la síntesis de la deshidrolabuanina B, un regioisómero de la meridina que ha sido aislado recientemente de la esponja *Biemnia fortis* y que tiene un gran interés biológico por ser un inductor de la neuritogénesis (32). Como se muestra en la figura 8.a, la reacción entre el azadieno **8.1** y la quinona halogenada **8.2** en condiciones de irradiación ultrasónica condujo al derivado de 1,5-diazaantraquinona **8.3**, que fue transformada posteriormente en el producto natural por ciclación reductora seguida de hidrólisis. Una ruta alternativa, que no se comentará aquí, utilizó como etapa clave una reacción de Stille (33). La síntesis de la deshidrolabuanina B fue el resultado de una colaboración con el Instituto Biomar.

En lo que se refiere a la tercera estrategia de la figura 5, voy a comentar su aplicación a la síntesis de la tetrahidroascididemina. Como se muestra en la figura 8.b, la reacción de Friedländer entre la *o*-aminoacetofenona **8.4** y la ciclohexanona, seguida de desmeti-

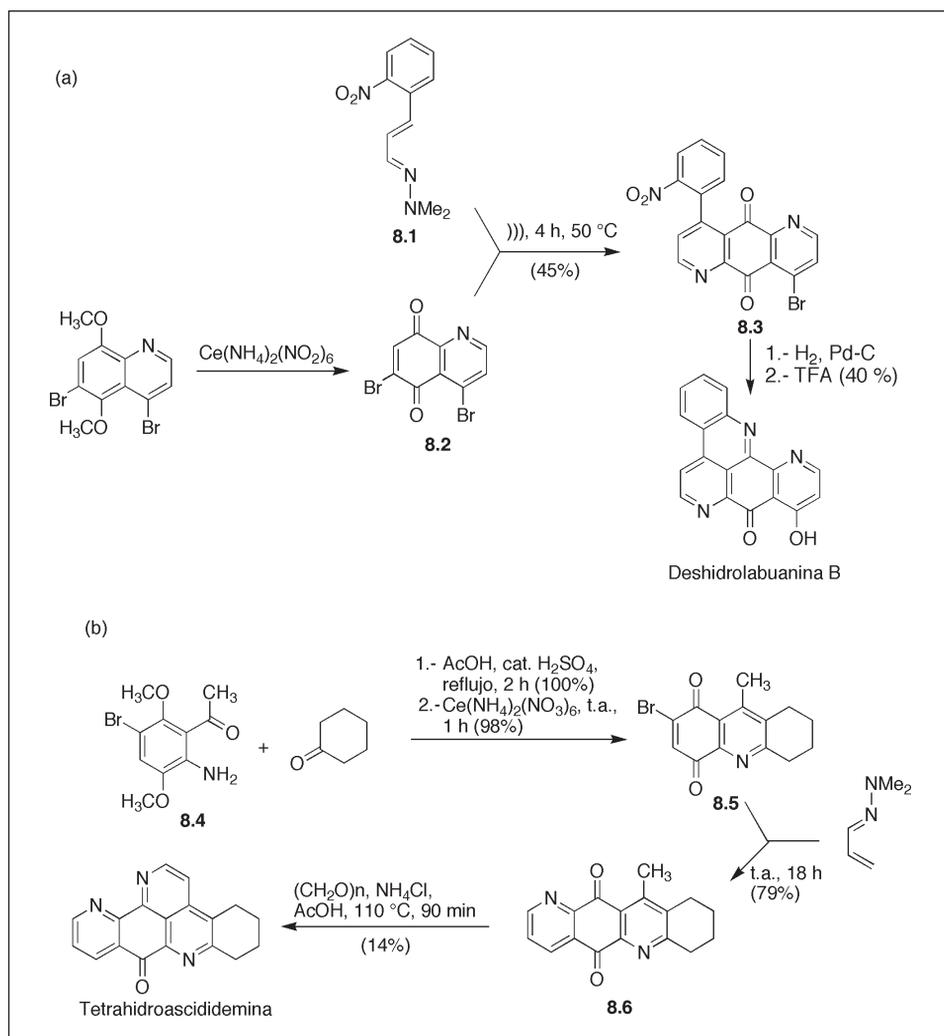


FIGURA 8: (a) Síntesis de la deshidrolabuanina B con una reacción hetero Diels-Alder como etapa clave. (b) Síntesis de la tetrahidroascididemina basada en el uso conjunto de reacciones de Friedländer, hetero Diels-Alder y Mannich

lación oxidativa con nitrato cérico amónico, proporcionó el derivado de acridinaquinona **8.5**. Una reacción de tipo hetero Diels-Alder de este compuesto con la dimetilhidrazona de la acroleína condujo al sistema tetracíclico **8.6** (34), que se transformó en la tetrahidroascididemina por medio de una reacción de Mannich (35). Este compuesto presenta una actividad antitumoral *in vitro* similar a la de la ascididemina, lo que indica que la actividad del producto natural no requiere que su anillo D sea aromático. Este descubrimiento es significativo porque puede servir de base para la preparación de análogos no totalmente planos de ascididemina que mantengan la actividad y para los que cabe esperar una mayor solubilidad que la del producto natural ya que deben estar dificultadas las interacciones de apilamiento entre sistemas aromáticos

PRODUCTOS NATURALES PROCEDENTES DE MICROORGANISMOS MARINOS. SÍNTESIS DE LA TRIPROSTATINA B

Con frecuencia ocurre que dos o más grupos de organismos marinos producen el mismo tipo de sustancias; por ejemplo, los compuestos del grupo de las piridoacridinas se han aislado a partir de esponjas y tunicados. Si se considera la enorme distancia evolutiva entre ambos grupos de organismos, resulta sorprendente que produzcan compuestos similares. Este tipo de situaciones han conducido a la sospecha de que quizá muchos de los compuestos aislados de invertebrados marinos sean producidos en realidad por microorganismos asociados, lo cual se ha confirmado en algunos casos (36, 37). Hay que tener en cuenta, además, que los microorganismos asociados pueden constituir hasta un 40% de la masa de determinados invertebrados marinos, como las esponjas. Si se consiguiera identificar y cultivar estos microorganismos, los compuestos derivados de ellos podrían obtenerse por fermentación y sería mucho más sencillo disponer de cantidades adecuadas para los ensayos biológicos. Por el mismo motivo, se puede considerar muy interesante la investigación de productos naturales aislados de microorganismos marinos (38).

Entre los productos de interés aislados de microorganismos marinos, mencionaremos las triprostatinas, procedentes de una cepa

marina del hongo *Aspergillus fumigatus*. Estos compuestos son de interés biológico por comportarse como inhibidores del ciclo celular en la transición G₂/M por inhibición de la interacción entre una de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP-2) y el extremo C-terminal de la tubulina (39), y también como inhibidores de BRP, una proteína de resistencia a antitumorales (40). Debido a este interés, iniciamos un proyecto orientado al desarrollo de una síntesis

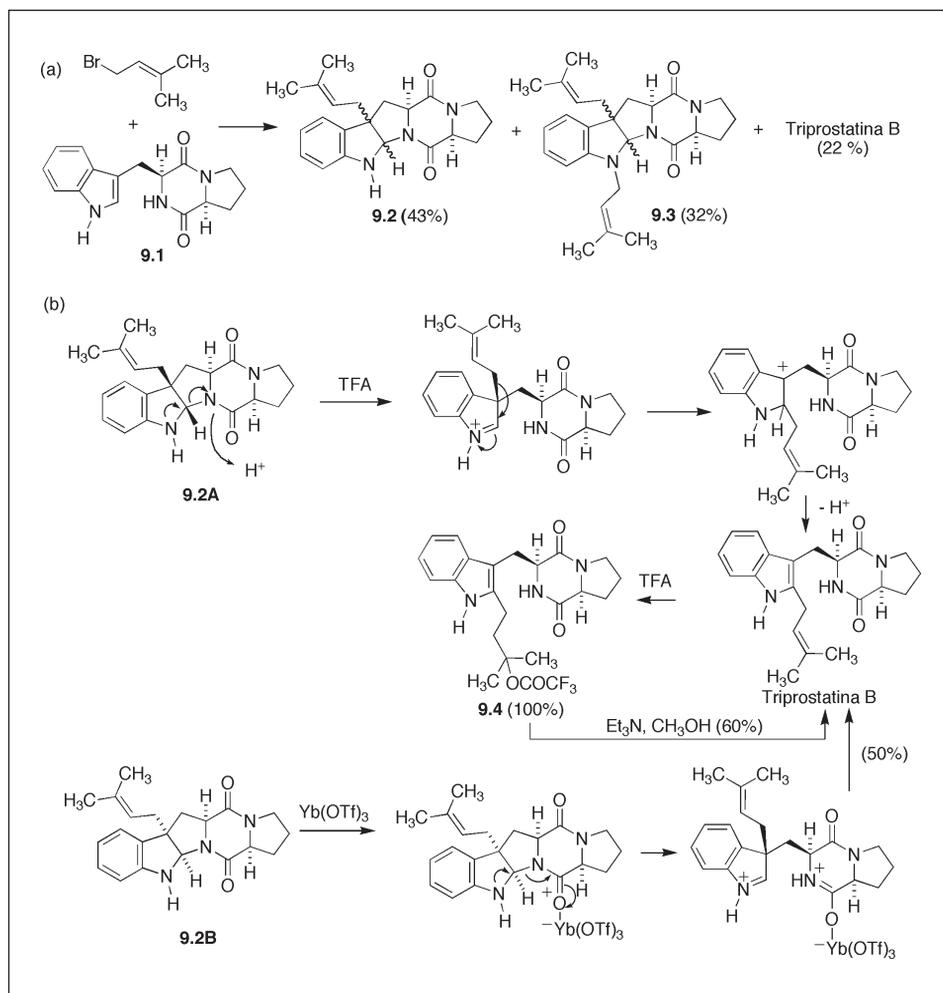


FIGURA 9. Síntesis total de la triprostatina B.

total de la triprostatina B que pudiera adaptarse a la preparación de análogos. En aquel momento existían dos síntesis de las triprostatinas, basadas en la preparación y posterior transformación de un derivado del 2-prenilriptófano. Nuestra estrategia, en cambio, se basaba en un proceso tandem de alquilación/ciclación de la piperazinadiona **9.1** por tratamiento con bromuro de prenilo en medio acuoso tamponado, que proporcionó los compuestos **9.2**, **9.3** (ambos como una mezcla de dos diastereoisómeros) y triprostatina B.

De los dos diastereoisómeros de estructura **9.2**, el que presenta el grupo prenilo en *trans* respecto al hidrógeno de prolina (compuesto **9.2A**) experimentó la transposición deseada por tratamiento con ácido trifluoroacético, según el mecanismo resumido en la figura 10. No fue posible evitar que el doble enlace de la triprostatina así obtenida reaccionara con el ácido trifluoroacético para dar el compuesto **9.4**, que fue posteriormente transformado en el compuesto deseado por eliminación en presencia de base. En cambio, el otro diastereoisómero (compuesto **9.2B**) no experimentó la transposición en presencia de ninguno de los ácidos protónicos ensayados, aunque pudimos lograrla por tratamiento con triflato de iterbio, un ácido de Lewis (41). Utilizando la misma estrategia, se llevó a cabo la preparación del análogo de triprostatina B derivado de alanina, aunque ni este compuesto ni la propia triprostatina B mostraron actividad antitumoral significativa en las líneas celulares donde se ensayaron.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La resolución del problema del suministro de cantidades suficientes de los compuestos de origen marino es esencial para que su uso pueda generalizarse (42). Este objetivo requerirá mejoras en las técnicas de cultivo de organismos marinos, incluyendo sus microorganismos simbiotes productores de compuestos de interés, en caso de haberse identificado, lo que es extremadamente difícil a causa de su íntima adaptación evolutiva al organismo hospedador. Una aproximación alternativa puede basarse en la clonación y expresión de los genes responsables de la biosíntesis de los compuestos de interés, que permitiría la creación de cepas bacterianas susceptibles de cultivo que los contengan. También es de esperar que se registren

avances significativos en el desarrollo de métodos sintéticos, que permitan el acceso eficiente a los productos naturales y la preparación de análogos mejorados. Otro campo en el que cabe esperar avances es el del desarrollo de métodos de ensayo biológico ligados al mecanismo de acción, lo que permitirá seleccionar los compuestos prometedores en función de éste y no de una simple actividad citotóxica.

No quisiera concluir sin reiterar mi agradecimiento a los miembros de esta corporación por acogerme en ella, y a todos los presentes por su amable atención. Muchas gracias a todos.

REFERENCIAS

- (1) MAYER, A. M. S. (2002): Current Marine Pharmacology Contributions to New Drug Development in the Biopharmaceutical Industry. *Pharmaceutical News*, 9, 479.
- (2) BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MURO, M. H. G. (2003): Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 1.
- (3) GARCÍA-FERNÁNDEZ, L. F.; REYES, F.; SÁNCHEZ-PUELLES, J. M. (2002): The Marine Pharmacy: New Antitumoral Compounds from the Sea. *Pharmaceutical News*, 9, 495.
- (4) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. C. (2004): Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1693.
- (5) RINEHART, K. (2000): Antitumor Compounds from Tunicates. *Med. Res. Rev.*, 20, 1.
- (6) VERA, M.; JOULLIE, M. M. (2002): Natural Products as probes of Cell Biology: 20 Years of Didemnin Research. *Med. Res. Rev.*, 22, 102.
- (7) JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; FERNÁNDEZ SOUSA-FARO, J. M.; SCHEUER, P.; RINEHART, K. (2004): New Marine Derived Anticancer Therapeutics? A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs*, 1, 14.
- (8) MANZANARES, I.; CUEVAS, C.; GARCÍA-NIETO, R.; MARCO, E.; GAGO, F. (2001): Advances in the Chemistry and Pharmacology of Ecteinascidins, A Promising New Class of Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 1, 257.
- (9) NAGLE, D. G.; ZHOU, Y.-D.; MORA, F. D.; MOHAMMED, K. A.; KIM, Y.-P. (2004): Mechanism Targeted Discovery of Antitumor Marine Natural Products. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1725.
- (10) DIAS, N.; VEZIN, H.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C. (2005): Topoisomerase Inhibitors of Marine Origin and Their Potential Use as Anticancer Agents. *Topics in Current Chemistry* 253, 89.
- (11) DELFOURNE, E.; BASTIDE, J. (2003): Marine Pyridoacridine Alkaloids and Synthetic Analogues as Antitumor Agents. *Med. Res. Rev.*, 23, 234.

- (12) MARSHALL, K. M.; BARROWS, L. R. (2004): Biological Activity of Pyridoacridines. *Nat. Prod. Rev.*, *21*, 731.
- (13) SKYLER, D.; HEATHCOCK, C. H. (2002): The Pyridoacridine Family Tree: A Useful Scheme for Designing Synthesis and Predicting Undiscovered Natural Products. *J. Nat. Prod.*, *65*, 1573.
- (14) MATSUMOTO, S. S.; BIGGS, J.; COPP, B. R.; HOLDEN, J. A.; BARROWS, L. R. (2003): Mechanism of Ascidiemin-Induced Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, *16*, 113.
- (15) BONNARD, I.; BONTEMPS, LAHMY, S.; BANAIGS, B.; COMBAUT, G.; FRANCISCO, C.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; WARING, M. J.; BAILY, C. (1995): Binding to DNA and Cytotoxic Evaluation of Ascidiemin, the Major Alkaloid from the Mediterranean Ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Anticancer Drug Des.*, *10*, 333.
- (16) DASSONNEVILLE, L.; WATTEZ, N.; BALDEYROU, B.; MAHIEU, C.; LANSIAUX, A.; BANAIGS, B.; BONNARD, I.; BAILY, C. (2000): The Marine Alkaloid Ascidiemin Stimulates DNA Cleavage by Topoisomerase II and Induces Apoptosis in Leukemia Cells. *Biochem. Pharmacol.*, *60*, 527.
- (17) DIRSCH, V. M.; KIRSCHKE, S. O.; ESTERMEIER, M.; STEFFAN, B.; VOLLMAR, A. M. (2004): Apoptosis Signaling Triggered by the Marine Alkaloid Ascidiemin is Routed via Caspase-2 and JNK to Mitochondria. *Oncogene*, *23*, 1586.
- (18) MARSHALL, K. M.; MATSUMOTO, S. S.; HOLDEN, J. A.; CONCEPCIÓN, G. P.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; BARROWS, L. R. (2003): The Anti-Neoplastic and Novel Topoisomerase II-Mediated Cytotoxicity of Neoamphimedine, a Marine Pyridoacridine. *Biochem. Pharmacol.*, *66*, 447.
- (19) DELFOURNE, E.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BASTIDE, J. (2000): Structure Revision of the Marine Pentacyclic Aromatic Alkaloid: Cystodamine. *Tetrahedron Lett.*, *41*, 3863.
- (20) SCHMITZ, F. J.; DE GUZMÁN, F. S.; HOSSAIN, M. B.; VAN DER HELM, D. (1991): Cytotoxic Aromatic Alkaloids from the Ascidian *Amphicarpa Meridiana* and *Leptoclinides sp.*: Meridine and 11-Hydroxyascidiemin, *J. Org. Chem.*, *56*, 804.
- (21) ECHAVARREN, A. M.; STILLE, J. K. (1988): Total Synthesis of Amphimedine. *J. Am. Chem. Soc.*, *110*, 4051.
- (22) ECHAVARREN, A. M. (1996): Recent Developments in the Synthesis of Marine Pyridoacridine Alkaloids. *Advances in Nitrogen Heterocycles*, *2*, 211.
- (23) PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Efficient Synthesis of the Pyrido[2,3,4-*kl*]Acridin-4-One System Common to Several Cytotoxic Marine Alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, *44*, 6003.
- (24) PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Improvements in the Hetero Diels-Alder Reactions of 1-Dimethylamino-1-azadienes in the Presence of an Electrophilic Scavenger Resin. *Synlett*, 205.
- (25) PÉREZ, J. M.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; ALONSO, M. A.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1996): Silica Gel-Supported Hetero Diels-Alder Reactions of Quinolinetrienes. *Tetrahedron Lett.*, *37*, 6955.
- (26) PÉREZ, J. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1995): 1-Acylamino-1-azadienes as an Alternative to 1-Dimethylamino-1-azadienes in the Preparation of 1,8-Diazaanthracene-2,9,10-triones. *Tetrahedron*, *51*, 6573.

- (27) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1998): Recent Progress in the Synthesis of Antitumour Azaanthraquinones. *Recent Res. Devel. in Organic Chem.*, 2, 69.
- (28) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2000): "(*o*-Trifluoroacetamido)-cinnamaldehyde Dimethylhydrazone, a Useful Azadiene in the Hetero Diels-Alder Approach to the Pyrido[2,3,4-*kl*]acridine system". *Synlett*, 689.
- (29) FERNÁNDEZ PUENTES, J. L.; GARCÍA GRÁVALOS, D.; AVENDAÑO, C.; BLANCO, M. M.; MENÉNDEZ, J. C. Cytotoxic Compounds: Derivatives of the Pyrido[2,3,4-*kl*]acridine Ring System. US Patent 6,656,948 B2 (2-Diciembre-2003).
- (30) PÉREZ, J. M.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2000): Concise Preparation of 1,8-Diazaanthracene-2,7,9,10-tetraones. Two Alternative Syntheses of the Natural Antifolate Diazaquinomycin A. *Tetrahedron* 56, 1561.
- (31) VILLACAMPA, M.; PÉREZ, J. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1994): Ultrasound Assisted Diels-Alder Reactions of 1-Azadienes with "Normal" Electronic Demand. *Tetrahedron*, 50, 10047.
- (32) AOKI, S.; WEI, H.; MATSUI, K.; RACHMAT, R.; KOBAYASHI, M. (2003): Pyridoacridine Alkaloids Inducing Neuronal Differentiation in a Neuroblastoma Cell Line, from Marine Sponge *Biemna fortis*. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1139.
- (33) DE LA FUENTE, J. A.; MARTÍN, M. J.; BLANCO, M. M.; PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2001): A Regioisomer of the Marine Alkaloid Meridine Exhibits Selective *in vitro* Cytotoxicity for Solid Tumours. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1807.
- (34) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1999): Concise Synthesis of Tetrahydro Derivatives of the Pyrido[2,3-*b*]acridine and Pyrido[3,2-*b*]acridine Ring Systems. *Tetrahedron*, 55, 12637.
- (35) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1999): Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroascididemin. *Tetrahedron Lett.*, 40, 4097.
- (36) LUESCH, H.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; MOOBERRY, S. L.; CORBETT, T. H. (2001): *J. Nat. Prod.*, 64, 907.
- (37) DE ROSA, S.; MITOVA, M.; TOMMONARO, G. (2003): Marine Bacteria Associated with Sponge as Source of Cyclic Peptides. *Biomol. Eng.*, 20, 311.
- (38) FENICAL, W.; SETHNA, K. M.; LLOYD, G. K. (2002): Marine Microorganisms as a Developing Resource for Drug Discovery. *Pharmaceutical News*, 9, 489.
- (39) USUI, T.; KONDOH, M.; CUI, C.; MAYUMI, T.; OSADA, H. (1998): Tryprostatin A, a Specific and Novel Inhibitor of Microtubule Assembly. *Biochem. J.*, 333, 543.
- (40) WOEHLECKE, H.; OSADA, H.; HERRMANN, A.; LAGE, H. (2003): Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int. J. Cancer*, 107, 721.
- (41) CABALLERO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Brief Total Synthesis of the Cell Cycle Inhibitor Tryprostatin B and Related Preparation of its Alanine Analog. *J. Org. Chem.*, 68, 6944.
- (42) PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R. A.; EBEL, R. (2003): Drugs from the Sea? Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs*, 1, 5.

Estallido respiratorio de los fagocitos

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El estallido respiratorio de los fagocitos, producido por la NADPH-oxidasa, complejo enzimático que cataliza la formación de radical superóxido, constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Este sistema comprende un complejo flavocitocromo b558 unido a membrana, y factores citosólicos p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y la pequeña GTPasa Rac2, que se traslocan a la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. El conocimiento de las interacciones proteína-proteína que permiten el ensamblaje y el mecanismo de acción enzimático, ha permitido detectar los cambios que transcurren en el estado activo. La importancia de la NADPH oxidasa se muestra en la enfermedad granulomatosa crónica, patología transmitida por herencia, en la cual un componente de la NADPH oxidasa está ausente o defectivo. Tales individuos padecen infecciones recurrentes crónicas y severas debido a la incapacidad de sus neutrófilos para destruir microbios.

Palabras clave: NADPH oxidasa.—Neutrófilos.—Flavocitocromo b558.—Enfermedad granulomatosa crónica.

ABSTRACT

The phagocyte respiratory burst produced by the NADPH oxidase, enzyme complex which catalyzes the production of superoxide radical, is one of the main endogenous sources of reactive oxygen species in the body. NADPH oxidase consists of a membrane-bound flavocytochrome *b*₅₅₈ complex, and cytosolic factors p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} and the small GTPase Rac, which translocate to the membrane to assemble the active complex following cell activation. A great deal of current

research involves understanding the protein protein interactions involved in the assembly and enzyme mechanism and how these change with the activation state. The importance of the NADPH oxidase is illustrated by the inherited condition Chronic Granulomatous Disease in which a component of the respiratory burst oxidase is absent or defective. Affected individuals suffer from recurrent, chronic and severe infections due to the inability of their neutrophils to kill microbes.

Key words. NADPH oxidase.—Neutrophils.—Flavocytochrome b558.—Chronic granulomatous disease.

INTRODUCCIÓN

La actividad de la NADPH-oxidasas fagocítica constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Este sistema enzimático está constituido por varias proteínas distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática. Durante la activación leucocitaria, los componentes ubicados en el citosol tienen que emigrar a la membrana plasmática, que es donde se verifica el ensamblaje del complejo funcional que conforma el sistema enzimático activo [1]

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), son movilizados a los sitios de inflamación donde destruyen a los agentes invasores, mediante la liberación de radical superóxido, especies reactivas del oxígeno derivadas y enzimas proteolíticas. Un defecto en la función de estas células constituye una grave amenaza para la vida. Tal es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica, en la que los PMN no pueden producir especies reactivas de oxígeno y las personas afectadas padecen infecciones graves. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno, liberadas por los PMN, pueden en ocasiones, provocar daño a los tejidos vecinos, como se ha descrito en varias enfermedades.

La NADPH-oxidasas cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El $O_2^{\cdot-}$ se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Estos, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y a los enzimas proteolíticos de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los PMN [1, 2, 3] La NADPH oxidasa fagocítica origina el radical superóxido, esencial para la defensa antimicrobiana. Los linfocitos B y ciertas células no fagocíticas expresan también este enzima.

SISTEMA DE LA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA

La presencia de oxígeno es un requisito vital para la destrucción y digestión de los agentes patógenos por los fagocitos, pero no es necesaria para la fagocitosis misma. Cantidades considerables de oxígeno se consumen en el estallido respiratorio (*respiratory burst*), proceso que ha fascinado a los científicos desde hace casi cincuenta años.

En 1959 Sbarra y Karnosky [4], cuando se encontraban investigando la fagocitosis del bacilo de la tuberculosis por neutrófilos, detectaron un súbito incremento en el consumo de oxígeno por estas células, el cual era resistente a inhibidores de la cadena mitocondrial, tales como la azida sódica y el cianuro. Observaron que este consumo de oxígeno no coincidía con la respiración mitocondrial y pensaron que debería encontrarse involucrado en algún otro proceso diferente al de la producción de energía, el cual era requerido para destruir microorganismos y era suministrado por la glucólisis. El sustrato natural de esta oxidasa fue un tema de considerable especulación y por fin se descubrió que era el equivalente reductor NADPH, cuyo suministro se debía a la oxidación de la glucosa por el ciclo de las pentosa fosfatos. Estos autores denominaron a este sistema “NADPH oxidasa”.

Los PMN adquieren la capacidad de producir especies activas de oxígeno (ROS) cuando experimentan la activación. Este fenómeno se caracteriza por el aumento súbito del consumo de oxígeno (O_2), antes citado, no asociado al transporte electrónico mitocondrial, catalizado por el sistema NADPH oxidasa y denominado “*estallido respiratorio*”. La producción “explosiva” de radical superóxido en respuesta a estímulos externos es una propiedad característica de los fagocitos profesionales. Esta producción es utilizada por las células para destruir bacterias y es también componente importante de la respuesta inflamatoria.

Los fagocitos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos juegan un papel esencial en la defensa innata del organismo frente a agentes patógenos y actúan como mediadores primarios de la respuesta inflamatoria. Para defender al organismo, los neutrófilos utilizan una amplia variedad de productos microbicidas, tales como oxidantes, péptidos, enzimas líticos, etc. La generación de oxidantes microbici-

das por los neutrófilos se debe al complejo multiproteico NADPH oxidasa, antes mencionado, responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH al O_2 , con la simultánea producción de radical superóxido. Durante la activación de la oxidasa, diversas proteínas citosólicas se traslocan a la membrana plasmática que rodea al fagosoma, donde se ensamblan a otro complejo unido a membrana el flavocitocromo b558. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales.

Cabe preguntarse ¿de qué manera el estallido respiratorio induce la destrucción de patógenos por células normales?. El producto de la reacción catalizada por la NADPH oxidasa, se identificó al principio como H_2O_2 por su capacidad para oxidar el formato. Posteriormente se demostró por Babior, Kipnes y Curnutte en 1973 [5] que el H_2O_2 procedía de la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Cuando los neutrófilos fagocitan partículas, el anión superóxido se produce en aquella región de la membrana plasmática en contacto directo con la partícula. Después ha de transcurrir un período (fase "lag"), que propociona al fagocito el tiempo requerido para la formación y cierre de una vacuola que limita la salida al exterior de las especies de oxígeno formadas.

Al descubrirse que los radicales libres de oxígeno se producían en grandes cantidades en la vacuola fagocítica (Figura 1), se responsabilizó a estos radicales de la destrucción del microorganismo. Sin embargo, tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno son relativamente poco reactivos, de manera que hubo que buscar otras explicaciones.

El contenido de los gránulos citoplasmáticos es también importante. Los citoplastos, cuerpos enucleados sin gránulos, fagocitan las bacterias normalmente y producen un estallido respiratorio normal, pero destruyen las bacterias con poca eficiencia. La mieloperoxidasa, uno de los principales constituyentes de los gránulos, puede utilizar el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el $OHCl$ y las cloraminas. Sin embargo, en casos de deficiencia en mieloperoxidasa, la destrucción de los microbios no resultaba abiertamente defectuosa, por tanto, tenían que estar necesariamente implicados otros factores en el efecto del esta-

lido respiratorio y en la destrucción de las proteínas de los gránulos. La explicación parece notablemente simple: el bombeo hacia el interior de la vacuola de concentraciones milimolares de electrones, no acompañada de protones, origina el consumo de iones de hidrógeno en el lumen de dicha vacuola, con la consiguiente elevación del pH. El contenido de los gránulos se mantiene en estado inactivo a pH 5.0 y las proteasas neutras se activan cuando se exponen al medio relativamente alcalino de la vacuola [6 - 8].

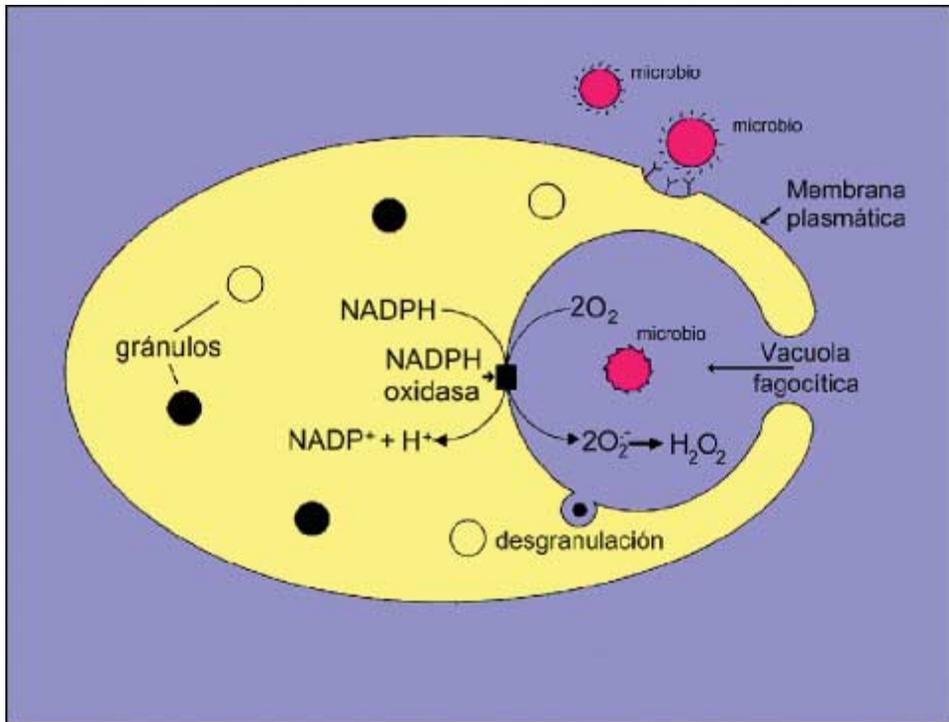


FIGURA 1. Representación esquemática de un fagocito atrapando un microorganismo en la vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa se activa selectivamente en la membrana de la vacuola y genera O₂⁻ y H₂O₂ en el lumen de la vacuola. Otros enzimas se liberan en la vacuola por desgranulación de los gránulos citoplasmáticos [8].

Los fagocitos circulantes (leucocitos polimorfonucleares y monocitos) y los macrófagos de los tejidos, como las células de Kupffer en el hígado y las células de la microglia en cerebro, son capaces de

generar cantidades sustanciales de radical superóxido. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos, son los más activos en este aspecto, puesto que llegan a producir hasta 100 nmoles de radical superóxido por millón de células, cuando se estimulan con 10 ng del éster de forbol 12 miristato 13 acetato (PMA). La NADPH oxidasa fagocítica es un complejo ligado a membrana, denominado también “oxidasa del estallido respiratorio”, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular con la consiguiente producción del radical superóxido.

En fagocitos quiescentes (en reposo), la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. El estímulo fisiológico de la NADPH oxidasa en fagocitos incluye la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la linfotoxina, el interferón γ , péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la rotura del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. Estímulos poderosos no fisiológicos son el PMA, activador de la proteína quinasa C y el agente activador de las proteínas G (AIF $_3$).

La NADPH oxidasa, responsable del estallido respiratorio de los fagocitos, genera el radical superóxido como producto primario, el cual en sí mismo es un oxidante débil. Sin embargo, en una serie de reacciones posteriores, este radical da origen a oxidantes más potentes, tales como:

- **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), vía dismutación espontánea o catalizada enzimáticamente por las superóxido dismutasas;
- **radical hidroxilo** ($\cdot OH$) por reacción del $O_2^{\cdot -}$ con el H_2O_2 , en presencia de hierro bivalente (reacción de Fenton);
- **hipohaluros**, como el ácido hipocloroso ($OHCl$), generado al reaccionar el anión Cl^- con el H_2O_2 , mediante la acción catalítica de la mieloperoxidasa.

De esta manera, la NADPH oxidasa juega un papel crítico en la producción de un grupo complejo de ROS. En los fagocitos, estas especies reactivas van a ser utilizadas como agentes microbicidas, particularmente frente a las bacterias y hongos catalasa positivos.

Los fagocitos cuentan también con otros recursos antimicrobianos oxidativos, como el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y otros no oxidativos, como proteasas y péptidos bactericidas procedentes de los gránulos.

Por último, la interacción del $\text{NO}\cdot$ con el O_2^- da origen al peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), agente que se descompone en radical nitroso y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), siendo este último mucho más potente que los anteriores [7, 9].

COMPONENTES DEL SISTEMA NADPH OXIDASA

La mayor parte del conocimiento actual de la NADPH oxidasa se ha conseguido estudiando los diferentes subgrupos de la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), donde este complejo enzimático es genéticamente defectivo. Analizando los fagocitos de tales pacientes, se han descubierto los componentes clásicos de este sistema. Estos son: la glicoproteína $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y los polipéptidos p22^{phox} , p67^{phox} , p47^{phox} y p40^{phox} , todos ellos codificados por el gen *phox* (phagocyte oxidase) en el cromosoma X. El flavocitocromo b558 forma el complejo asociado a membrana, que está formado por una molécula de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ y dos moléculas de p22^{phox} . Los polipéptidos p67^{phox} , p47^{phox} y p40^{phox} se encuentran en el citoplasma. Otros dos componentes, relacionados estructuralmente con el producto del oncogen ras, Ras2 y Rap1A, se encuentran también en el citoplasma y participan en la activación de este sistema.

Flavocitocromo b558: Es el componente redox de la NADPH oxidasa, un sistema de transferencia electrónica que genera el radical superóxido. Es un heterodímero que se localiza en la membrana de los gránulos específicos (90 %) y la membrana plasmática (10 %) cuando el PMN está en reposo. Después de la activación, el flavocitocromo b558 emigra desde la membrana de los gránulos específicos hacia la membrana plasmática o la de los fagosomas. Está compuesto por 2 subunidades diferentes: una glicoproteína de 91 kDa ($\text{gp91}^{\text{phox}}$) y otra proteína no glicosilada de 22 kDa (p22^{phox}). La subunidad mayor se sintetiza originalmente como una proteína de 65 kDa, pero la N-glicosilación en los residuos de tres aminoácidos 131, 148 y 239, la hace mostrarse como una banda difusa de 91 kDa

en geles SDS. Contiene una región de homología con la región de unión al NADPH de varias flavoenzimas, incluyendo la citocromo P-450 reductasa y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, y también muestra homología con el sitio de unión al FAD de varias deshidrogenasas flavoproteicas. El complejo flavocitocromo b558 es, por tanto, una flavoproteína que contiene 2 grupos hemo por cada FAD [1, 3], siendo la subunidad gp91^{phox} la que posee los sitios de unión para el FAD y el NADPH [4]. De acuerdo con este modelo, el terminal-N muy hidrofóbico de gp91^{phox} atraviesa la membrana plasmática al menos cinco veces. Esta región es la que contiene los dos grupos hemo, que parecen descansar en una disposición transmembrana.

La subunidad pequeña, p22^{phox}, del flavocitocromo b558, contiene dos secuencias ricas en prolina en la región C-terminal, una de las cuales es similar a la secuencia consenso para la unión de las regiones SH3. Este dominio se une a un dominio SH3 de p47^{phox}. En un modelo estructural, la secuencia contiene también un terminal-N hidrofóbico que cruza la membrana. Esta subunidad posee una sola histidina conservada evolutivamente y este residuo se ha propuesto que coopera con la subunidad gp91^{phox} para formar uno de los sitios de unión a los grupos hemo. Esta disposición coloca el C-terminal rico en prolina, en el lado citosólico de la membrana donde puede interactuar con p47^{phox}. El flavocitocromo b558 se considera el componente central de la NADPH-oxidasa, pues contiene todos los elementos que le permiten transportar los electrones desde el NADPH hasta el O₂ [1, 3, 10].

p47^{phox}: Esta subunidad se localiza en el citosol en forma libre y formando un complejo de 240 kDa con los otros 2 componentes citosólicos: p67^{phox} y p40^{phox}, y es la responsable del transporte del complejo a la membrana durante la activación. Parece ser que p47^{phox} es el primer componente citosólico que interactúa con el flavocitocromo b558 durante el ensamblaje. Posee una región catiónica con múltiples sitios de fosforilación de serína/treonína quinasa, lo que se ha relacionado con su función reguladora. La fosforilación puede alterar la conformación o neutralizar la región catiónica de la proteína para facilitar el ensamblaje [11]. La desfosforilación inactiva al complejo. Esta proteína contiene dos dominios SH3 en la región central de la molécula. El primero de estos dominios se une a la secuencia rica en prolina situada en el C-terminal de p22^{phox}. El

segundo se une a una región rica en prolina, cerca del centro de la molécula de p67^{phox}. Las interacciones SH3 con las regiones ricas en prolina, a pesar de que son importantes, no parecen ser el único determinante de las interacciones proteína-proteína entre los componentes de la NADPH oxidasa [12 - 13].

En respuesta a la estimulación celular, la proteína p47^{phox} se fosforila *in vivo* en múltiples serinas situadas en la región C-terminal. La fosforilación parece ser parte de la señal de activación de la oxidasa, aunque puede estar implicada también la fosforilación de los otros dos componentes (p67^{phox} y p40^{phox}).

La proteína p47^{phox} no es esencial para la función de la NADPH oxidasa *in vitro*, siempre que existan grandes concentraciones de p67^{phox} y de Rac. Funcionalmente, el efecto de p47^{phox} es incrementar unas 100 veces la unión de p67^{phox} y 50 veces la unión de Rac. Así que, p47^{phox} parece ser una proteína adaptadora, y no parece participar directamente en la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa. Por tanto, el efecto regulador directo de la actividad oxidasa tiene que estar en Rac o en p67^{phox}.

p67^{phox}: Esta proteína se encuentra en el citosol unida al complejo de 240 kDa cuando el leucocito está en reposo. Comparte la unión al NADPH con gp91^{phox} y contiene una región central rica en prolina, seguida de un dominio SH3, con un segundo SH3 en la región C-terminal. Se desconoce la función del primer SH3. La proteína p67^{phox} se une a la p47^{phox} vía una interacción cola-cola, utilizando el dominio SH3 cercano al C-terminal de p67^{phox} para unirse a la secuencia rica en prolina en el C-terminal de p47^{phox}. Además, el segundo dominio SH3 de p47^{phox} se une a la región rica en prolina de p67^{phox}. La mitad N-terminal de p67^{phox} contiene una región de enlace para Rac, ya que la secuencia de aminoácidos (1-198) de p67^{phox} se une a Rac con la misma afinidad que lo hiciera la secuencia p67^{phox} completa [14].

No se conoce otra función para p67^{phox} que la de unirse a p47^{phox} y a Rac. En ausencia de p47^{phox}, p67^{phox} no puede ensamblarse con la NADPH oxidasa, lo que demuestra que p47^{phox} ejerce la función adaptadora, antes citada, para la unión de p67^{phox}. Se ha observado que existe una correspondencia de efectos entre p67^{phox} y p47^{phox}, que

indica la existencia de mutuas facilidades para la unión de estos dos componentes citosólicos.

p40^{phox}: Es el tercer componente del complejo citosólico. Se ha descrito de forma reiterada que puede regular negativamente la actividad del complejo [15] y se ha demostrado que en la activación sufre fosforilación que pudiera explicar dicha acción [16] p40^{phox}. Se caracterizó inicialmente como componente del complejo con p67^{phox} y p47^{phox} en el citosol de neutrofilos no activos. Puede interaccionar con el dominio rico en prolina de la región C-terminal de p47^{phox}, aunque no está claro que esto ocurra *in vivo*. Este componente emigra a la membrana celular después de la activación, unida a p47^{phox} y p67^{phox}. En un sistema libre de células p40^{phox} no es esencial para la actividad oxidasa y se ha descrito que inhibe dicha actividad. Puede ser que juegue un papel regulador o que ayude a mantener los factores citosólicos en un estado inactivo [17, 18].

Rac2: Es una proteína de unión al GTP que se encuentra en el citosol durante el reposo, unida a un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Rho-GDI). Con la activación intercambia GDP por GTP, se disocia del factor Rho-GDI y se trasloca a la membrana plasmática simultánea e independientemente del complejo de 240 kDa. Es esencial para la activación del sistema y se cree que está conectada a las vías de señalización tempranas. Desempeña además un importante papel en la quimiotaxis [19].

Rap1A: Es una proteína de la superfamilia Ras de proteínas de unión al GTP. Se asocia estrechamente con el flavocitocromo b558 en el momento de la activación, y a se vez, puede activar la proteína quinasa C y participar así en la regulación del complejo.

Rho-GDI: De la subfamilia Rho a la que pertenece Ras, está implicada en la regulación de una gran cantidad de procesos celulares importantes. La capacidad de Rac para estimular la producción de radical superóxido, se basa en su conversión desde la forma inactiva, unida a GDP, a la forma activa, unida a GTP. La traslocación a la membrana requiere un intercambio entre nucleótidos de guanina, por una proteína asociada a membrana, la GEF (guanin nucleotide exchange factor) acompañado por su liberación desde un complejo citosólico con la GDI (GDP dissociation inhibitor). Una propiedad común de todos los miembros de la subfamilia Rho, es su interacción con el

regulador negativo, la proteína GDI. El papel de Rho-GDI es mantener Rho/Rac en el citosol, distante de sus objetivos en la membrana, enmascarando el grupo geranilo-geranilo y también en un estado inactivo formando complejo con GDP. La asociación de Rac con GDI puede también inhibir la GAP (GTPase activating protein), que estimula la hidrólisis del GTP por Ras. Mediadores lipídicos como los inositol fosfolípidos regulan la actina del citoesqueleto y conducen a la formación de un complejo Rho/Rho-GDI en una conformación parcialmente abierta y ya preactivada [20].

ENSAMBLAJE DEL SISTEMA NADPH-OXIDASA

Tanto en el reposo como durante el ensamblaje se establecen interacciones entre los diferentes componentes del sistema NADPH oxidasa (figura 2). En esto desempeñan un importante papel las interacciones de los dominios SH3. Estas son regiones homólogas a las regiones no catalíticas de la familia Src de tirosina quinasas, que tienen afinidad por los residuos de prolina. Como en varios componentes del sistema existen tantos dominios SH3 como regiones ricas en prolina, esto facilita las interacciones entre las proteínas del complejo citosólico en el reposo y entre éstas y el flavocitocromo b558 en la activación. En estado quiescente la proteína p47^{phox} puede establecer este tipo de interacciones de forma intracatenaria, lo que provoca el secuestro de la región catiónica de la molécula. Durante la activación esta interacción se rompe y permite su unión a las regiones ricas en prolina de p22^{phox} en la membrana. Como las interacciones SH3 son poco específicas, se cree que su función sea alinear a las proteínas para el establecimiento de otras interacciones (no SH3) de mayor especificidad. Estas últimas han sido identificadas, tanto entre los componentes citosólicos, como entre éstos y el flavocitocromo b558. Entre ellas se destacan 3 posibles interacciones entre gp91^{phox} y p47^{phox}. Se supone que uno de estos sitios en gp91^{phox} interacciona con la región catiónica de p47^{phox} cuando esta se encuentra altamente fosforilada.

Basados en las diferentes interacciones identificadas entre los componentes del sistema multienzimático, DeLeo y Quinn [21], han elaborado un modelo que explica la forma y la secuencia en que se

produce el ensamblaje. Este modelo, unido a los resultados de investigaciones recientes, se plantea de forma resumida:

1. En el reposo, el complejo citosólico se mantiene estabilizado a través de diferentes interacciones incluidas las SH3. La región catiónica de $p47^{\text{phox}}$ está secuestrada, lo que impide su interacción con $p22^{\text{phox}}$ en la membrana.

2. En la activación, $p47^{\text{phox}}$ se fosforila y pierde la unión intracatenaria por dominio SH3. Esto expone los dominios SH3 y la región catiónica, lo que facilita su interacción con $p67^{\text{phox}}$. Después el complejo se trasloca a la membrana y se alinea a través de la interacción SH3 entre $p47^{\text{phox}}$ y las regiones ricas en prolina de $p22^{\text{phox}}$ [9]. En este momento la región catiónica de $p47^{\text{phox}}$ se libera de su unión a $p67^{\text{phox}}$ y establece un enlace de alta afinidad con el flavocitocromo

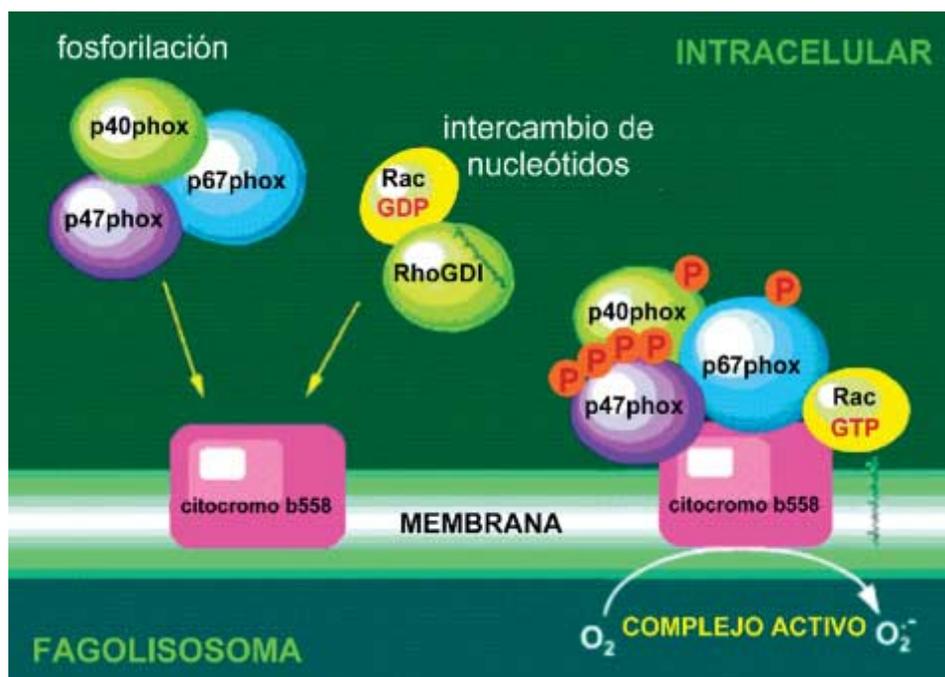


FIGURA 2. Ensamblaje de los componentes de la NADPH oxidasa para formar el complejo activo. A la izquierda se muestran los componentes de la NADPH oxidasa cuando la célula está en reposo. A la derecha se muestra el complejo activo. Para la formación del complejo activo $p47$ ha tenido que sufrir múltiples fosforilaciones en residuos de serina cercanos al C-terminal y Rac ha tenido que realizar intercambio de nucleótidos GDP/GTP.

b558, lo que puede deberse a la mayor fosforilación de p47^{phox} o a la acción de Rac [14, 21].

MECANISMO DE ACCIÓN

La NADPH-oxidasa cataliza la reacción:



Durante la transferencia de electrones, estos pasan desde el NADPH hacia el FAD, de éste a los grupos hemo y de éstos al O₂ [11]. La liberación de protones H⁺ en el compartimento citosólico

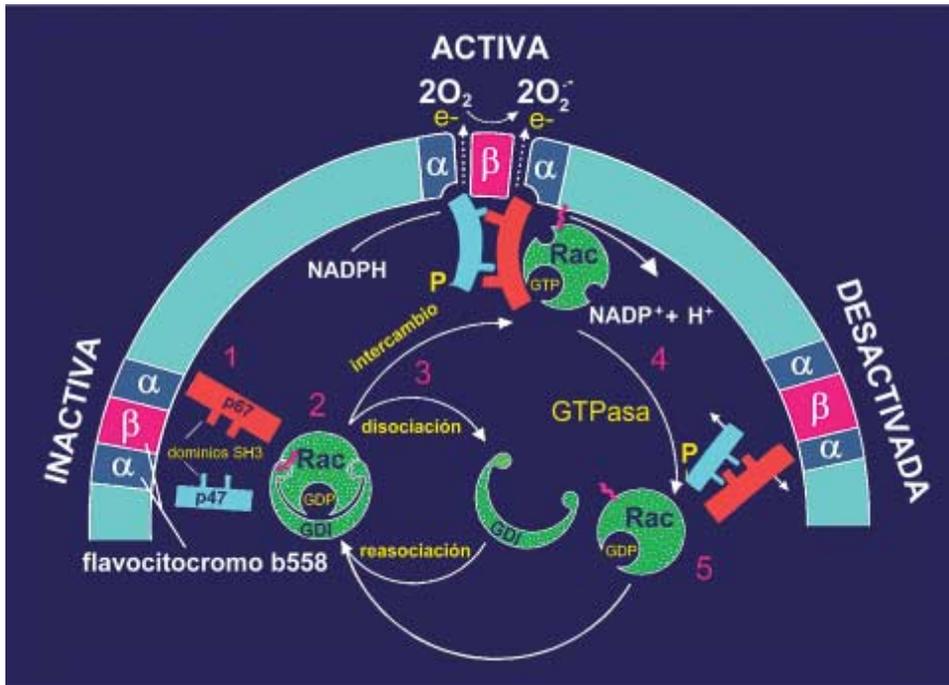


FIGURA 3. Activación y desactivación de la NADPH oxidasa. 1. Reconocimiento de los dominios SH3 de dos de las subunidades citosólicas p67^{phox} y p47^{phox}. 2. Acercamiento del complejo Rac/CDI. 3. Disociación de Rac/GDI, intercambio de nucleótidos, y ensamblaje de las subunidades al citocromo b558 con la consiguiente activación del complejo, formación de radical superóxido y salida de electrones (e⁻) al compartimento fagolisosómico. 4. actividad GTPasa que inactiva Ras. 5. Formación de Rac-GDP y separación del complejo. 6. reasociación Rac-GDP con RhoGDI.

produce una rápida despolarización de la membrana y una acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones en la propia estructura del sistema enzimático que permite el escape de estos hacia el espacio extracelular fagolisosómico. La proteína que funciona como canal es gp91^{phox}. Se sugiere que el mecanismo de flujo de protones a través de gp91^{phox} puede involucrar un ciclo de protonación/desprotonación de la His-115 en la medida en que ésta se expone alternativamente hacia el lado interior y exterior de la membrana [1, 3, 22] (Figura 3).

Cuando las células se rompen (por sonicación) y se separan por ultracentrifugación las fracciones citosólica y membranal, la NADPH oxidasa puede ser reconstituída, mezclando ambas fracciones y adicionando una sustancia anfifílica, como el dodecil sulfato sódico o el ácido araquidónico. Este tipo de activación de la NADPH oxidasa, en un medio libre de células, ha sido importante para profundizar en los mecanismos bioquímicos de este complejo y de su mecanismo de activación.

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (CGD): DEFICIENCIA DE NADPH OXIDASA

El ejemplo más dramático que pone de manifiesto la importancia de la NADPH oxidasa es la enfermedad granulomatosa crónica (CGD, **C**hronic **G**ranulomatous **D**isease), caracterizada por la ausencia de esta actividad enzimática, y por tanto del estallido respiratorio de los fagocitos en estos pacientes. Esta enfermedad se manifiesta por una predisposición, severa y prolongada, a infecciones con desenlace fatal. Los organismos responsables incluyen una variedad de bacterias y hongos, entre los cuales algunos, como la *Serratia marsescens*, no es patógeno en individuos normales. Como esta enfermedad es rara, las células de estos enfermos suponen un valioso sistema donde estudiar las propiedades de la NADPH oxidasa. En la actualidad se utilizan ratones Knockout deficientes en los genes *phox* [23].

La enfermedad crónica granulomatosa (CGD) es una inmunodeficiencia primaria rara, donde 2/3 de los casos muestran un patrón

de herencia recesiva ligado al cromosoma X y los casos restantes son autosómicos recesivos. Se refiere a un grupo heterogéneo de enfermedades de carácter hereditario que cursan con alteraciones del mecanismo de destrucción de los microorganismos porque las células fagocíticas son incapaces de generar superóxido y otras especies reactivas de oxígeno en los fagosomas intracelulares, propiciando la formación de granulomas. Los órganos más frecuentemente afectados son: ganglios linfáticos, piel, pulmones, hígado y aparato digestivo. Las lesiones pueden ser grandes y numerosas y causar efecto de masa, obstrucción y disfunción de los órganos afectados. El tratamiento con interferón γ incrementa la capacidad de los neutrófilos para generar superóxido, siendo más efectivo en pacientes con una mutación en la unión intrón exón adyacente al tercer intrón del gen que codifica la proteína gp91^{phox}.

La importancia crítica de la NADPH oxidasa para la defensa antimicrobiana está subrayada en la CGD como una rara patología de inmunodeficiencia primaria. La incidencia de esta enfermedad oscila entre 1/200.000 y 1/1.000.000 afectando sobre todo al sexo masculino. Los síntomas suelen manifestarse alrededor del primer o segundo año de la vida, aunque en casos más leves pueden retrasarse a la adolescencia e incluso mostrarse en la vida adulta. Es transmisible por herencia y se caracteriza por poseer fagocitos deficientes en la producción de radical superóxido. Los pacientes que sufren esta enfermedad viven amenazados durante toda su vida por infecciones recurrentes, debido a su incapacidad para destruir bacterias y hongos catalasa positivos. A pesar del tratamiento con antibióticos, la mayoría de ellos muere de infecciones antes de alcanzar los 40 años. El tratamiento con interferón recombinante parece que está dando buenos resultados para prolongar la vida a estos pacientes. Sin embargo, la mayor esperanza para ellos se cifra en restaurarles la actividad NADPH oxidasa por terapia génica somática.

Las vacuolas fagocíticas en los enfermos CGD son anormalmente pequeñas y los tejidos de estos pacientes están infiltrados de "granulomata" estructura formada por macrófagos y linfocitos. Estas anomalías parece que son consecuencia de la digestión defectuosa de microorganismos endocitados y residuos autólogos, una indigestión que se origina por vacuolas excesivamente ácidas.

Unos 2/3 de los casos de CGD se deben a mutaciones en el gen gp91^{phox}, que se sitúa en el cromosoma X. Una forma rara recesiva autosómica de CGD se debe a defectos en el gen que codifica la subunidad pequeña (p22^{phox}) del flavocitocromo b558. Cualquier defecto en estas dos proteínas influye en la formación del flavocitocromo b558. La formación del heterodímero p22-gp91-p22, parece que es esencial para la estabilidad intracelular de cada subunidad, ya que la deficiencia de una se asocia con la reducción marcada de la concentración de la otra. Dos formas autosómicas recesivas de la CGD están causadas por mutaciones en los genes que codifican las proteínas citoplasmáticas p47^{phox} y p67^{phox}. Estas mutaciones ocasionan defectos en la traslocación de estos dos componentes a la membrana. Existen otras mutaciones que afectan al sitio de enlace del NADPH en el C-terminal de gp91^{phox}. Las mutaciones relacionadas con p21^{Rac} son letales. CGD debida a una mutación en p40^{phox} no ha sido descrita hasta la fecha.

Cada uno de los genes *phox* que codifican los componentes de la NADPH oxidasa se han encontrado mutados en subgrupos de pacientes con CGD. El tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica con trasplante alogénico convencional de células madre hematopoyéticas, comporta un elevado riesgo de muerte y de complicaciones graves. Por ello, investigadores del Instituto Nacional de Alergia e Infecciones, de Bethesda, en Estados Unidos (Horwitz et al 2001) [24], han sugerido la posibilidad de realizar trasplante de células madre sin ablación de la médula ósea del receptor. Los resultados de esta investigación, indican que el acondicionamiento no mieloablativo seguido de un aloinjerto de células madres hematopoyéticas, tratado con una depleción de células T, es una opción posible en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, y con un familiar donante con idénticos antígenos HLA.

Los pacientes tratados fueron sometidos a un injerto de células madre de la sangre periférica de un hermano con un antígeno idéntico HLA. Según estos autores [24] se utilizó una pauta de acondicionamiento no mieloablativa consistente en ciclofosfamida, fludarabina y globulina antitimocitaria. El aloinjerto fue desprovisto de células T para reducir el riesgo de enfermedad severa contra huésped. Los linfocitos del donante se administraron a intervalos de 30 días después del injerto para facilitar el trasplante.

El diagnóstico de sospecha es clínico, el diagnóstico de confirmación se realiza demostrando el déficit de la capacidad oxidativa de los fagocitos, que se realiza con mayor frecuencia mediante la prueba del azul de tetrazolio, aunque también pueden realizarse otras técnicas como: medición directa de la producción de superóxido, reducción de ferrocitocromo u oxidación de dihidrorodamina con citometría de flujo. El tratamiento de las infecciones agudas debe ser agresivo y con los antibióticos apropiados, determinados mediante antibiograma (resultado del estudio de sensibilidad de un microbio frente a diversos antibióticos). Los abscesos de los ganglios linfáticos del cuello requieren drenaje quirúrgico. Se discute el uso de interferón- γ y de antibióticos preventivos para tratar de disminuir la frecuencia de las infecciones. Aunque el tratamiento antibiótico prolongado ayuda a reducir las infecciones, la severidad de las infecciones recidivantes pulmonares suele provocar la muerte prematura.

La CGD presenta una gran heterogeneidad genética y se han identificado diferentes mutaciones responsables de las formas genéticas de la enfermedad. En el 50-65% de los casos, la mutación afecta al gen que codifica la subunidad gp91^{phox} del complejo enzimático. Esta mutación se hereda como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X cuyo gen se localiza en el brazo corto de dicho cromosoma (Xp21-1), que puede estar ausente, truncado o mutado, de tal forma que el DNA no se transcriba o el RNA formado sea inestable. El resto de los casos se deben a mutaciones de los genes que codifican las subunidades p47^{phox}, p67^{phox} y p22^{phox}, localizadas en cromosomas somáticos, que se heredan con un patrón de herencia autosómico recesivo. Las mujeres heterocigotas portadoras de mutaciones gp91^{phox} no tienen riesgo de infecciones graves repetidas, aunque presentan mayor riesgo a padecer lupus discoide o sistémico y afecciones de la cavidad oral tales como estomatitis aftosa y queilitis granulomatosa.

La identificación de mutaciones genéticas responsables de la enfermedad granulomatosa crónica unida a la aplicación de las tecnologías de transferencia genética ha hecho posible la corrección genética de tales patologías. La CGD es el resultado de mutaciones en alguno de los genes que codifican las subunidades esenciales de la NADPH oxidasa del estallido respiratorio. El trasplante alogénico de médula ósea puede curar esta enfermedad, pero la toxicidad re-

lacionada al trasplante y la disponibilidad limitada de donantes apropiados, han restringido su aplicación. Como se conocen los defectos genéticos que causan esta enfermedad y también que es una patología que puede ser tratada por trasplante de médula, la CDG se está considerando una enfermedad prometedora para la terapia génica somática con células madres dirigidas al sistema hematopoyético. Es un hecho reconocido que la actividad NADPH oxidasa puede ser reconstituída por transferencia genética en líneas celulares humanas y de médula CGD, cultivadas *in vitro*. Se han obtenido modelos de CGD en ratones knockout y se han realizado estudios preclínicos sobre estos animales, usando vectores retrovéricos, que han demostrado la reconstitución de la funcionalidad de los neutrófilos normales y un aumento en la resistencia a patógenos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Burkholderia cepacia* y *Staphylococcus aureus* [25, 26].

EXCESO DE ACTIVIDAD NADPH OXIDASA

La hiperactividad de la NADPH oxidasa conlleva una exagerada producción de oxidantes, que puede causar un considerable daño tisular. Este daño incluye: deterioro funcional de los linfocitos T, citotoxicidad frente a células endoteliales, lesión directa al DNA de células cercanas y metabolismo oxidativo de agentes químicos, que van a generar compuestos citotóxicos, genotóxicos e inmunogénicos. La hiperactividad NADPH oxidásica fagocítica supone, por tanto, un mecanismo fisiopatológico que se encuentra presente en una gran variedad de estados inflamatorios agudos y crónicos (sepsis bacteriana, síndrome de angustia respiratoria en el adulto, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades reumáticas y vasculitis de diferentes orígenes).

Se han realizado numerosos intentos para modificar las reacciones inflamatorias, bien con enzimas que metabolicen las ROS (superóxido dismutasa y catalasa) o con agentes atrapadores de dichas especies, manitol, dimetil sulfóxido, N-acetilcisteína, etc), pero han sido solo parcialmente efectivos *in vitro* y en ciertos modelos experimentales de inflamación *in vivo*, y han fracasado como fármacos clínicamente útiles. Sería necesario disponer de inhibidores potentes

de la NADPH oxidasa, que al impedir la formación de radical superóxido, actuaran como agentes antiinflamatorios. Los recientes avances en el conocimiento del sistema NADPH oxidasa a nivel molecular han de poder ayudar a la búsqueda de estos agentes.

NADPH OXIDASA EXPRESADA ECTÓPICAMENTE

La expresión de la NADPH oxidasa en fagocitos se considera una característica funcionalmente relevante. Sin embargo, la generación de radical superóxido y la expresión de los componentes de la NADPH oxidasa (proteínas phox), existen en una serie de células no fagocíticas, tales como en linfocitos B, fibroblastos, células del cuerpo de la carótida, células neuroepiteliales de pulmón embrionario, líneas celulares de hematoma, etc. En todas estas células la NADPH oxidasa es "un enzima en busca de una función". Se ha pensado que participa en la regulación del crecimiento de fibroblastos y en el mecanismo celular que detecta la concentración de oxígeno en el medio e inicia reacciones hormonales o neuronales frente a la hipoxia. De los tipos de células que expresan la NADPH oxidasa, el linfocito B es la que se ha estudiado en profundidad. Una serie de investigaciones revela que las células B poseen un sistema generador de anión superóxido idéntico estructuralmente al de la oxidasa de fagocitos, pero menos activo. Esto se ha demostrado en células B de médula ósea, de amígdalas y en líneas celulares de linfocitos B transformados por el virus de Epstein Barr (EBV) [27]. Exceptuando el activador no fisiológico de la PKC (proteína quinasa C), el PMA (éster de forbol miristato acetato), los únicos estímulos identificados de la oxidasa de células B, han sido el entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie con los antígenos o anticuerpos nominales y de los antígenos de leucocitos humanos (HLA-DR) con anticuerpos. Por ello, la oxidasa de linfocitos es esencialmente la misma que la de fagocitos, aunque su activación a través de inmunoglobulinas de superficie y HLA-DR sea distinta a la de fagocitos. Consecuentemente, el modelo de oxidasa de los linfocitos B ha llegado a ser un medio fácil para el estudio de la NADPH oxidasa por medios de biología molecular no viables en fagocitos [28, 29]. Recientemente se ha detectado la presencia de una NADPH oxidasa funcional en células del epitelio del cristalino [29]. Numerosas investigaciones se en-

cuentran actualmente profundizando en la la función de esta oxidasa en células no fagocíticas, ya que su implicación en la producción de superóxido las hace relacionarse con procesos patológicos muy diversos, tales como cataratas, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. Es un hecho indiscutible que los radicales de oxígeno se encuentran implicados en numerosos procesos patológicos tales como inflamación y lesión tisular, incluyendo el daño producido por la reperfusión, mutagenesis, carcinogénesis y envejecimiento. Por tanto, es de esperar que se consiga alguna sustancia que frene la actividad oxidasa. Un fármaco inhibidor de la NADPH oxidasa sería de gran valor en el tratamiento de una amplia variedad de patologías relacionadas con situaciones inflamatorias crónicas.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Isabel Sánchez Reus y David Andrés García por su inestimable ayuda en la revisión crítica de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BABIOR, B. M. (2000): Phagocytes and oxidative stress *Am J Med* **109**, 33-44.
- (2) BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. (2002): The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* **397**, 342-344.
- (3) BABIOR, B. M. (2004): NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **16**, 42-47
- (4) SBARRA, A. J.; KARNOVSKY, M. L. (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**, 1355-1362.
- (5) BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S. Y CURNUTTE, J. T. (1973): Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**, 741-744.
- (6) MALY, F. E. Y SCHÜRER-MALY, C. (1995): How and Why cells make superoxide: The "phagocytic NADPH oxidase. *NIPS* **10**, 233-238
- (7) CASCALES, M. (1999): Inmunosenescencia. En: Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid, pp 169-192.
- (8) SEGAL, A. W. Y ABO, A. (1993): The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes *TIBS* **18**, 43-47
- (9) PARK, J. B. (2003): Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* **35**, 325-335
- (10) HENDERSON, L. M. (1998): Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J Biol Chem* **273**, 33216-33223.

- (11) MENDEZ, I. DE; HOMAYOUNPOUR, N.; LETO, T. L. (1997): Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* **17**, 2177-2185.
- (12) FREEMAN, J. L. Y LAMBETH, J. D. (1996): NADPH oxidase activity is independent of p47-phox in vitro *J Biol. Chem* **271**, 22578-22585.
- (13) FAUST, L. P.; EL BENNA, J.; BABIOR, B. M.; CHANOCK, S. J. (1995): The phosphorylation targets of p47-phox subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* **96**, 1499-1505.
- (14) DANG, P. M.; CROSS, A. R.; BABIOR, B. M. (2001): Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67 phox and cytochrome b558. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 3001-3005.
- (15) SATHYAMOORTHY, M.; MENDEZ, I. DE; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. (1998). p40(phox): down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* **272**, 9141-9146.
- (16) CROSS, A. R. (2000): p40phox participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of P47phox for flavocytochrome b558. *Biochem J* **349**, 113-117
- (17) BOUIN, A. P.; GRANDVAUX, N.; VIGNAIS, V.; FUCHS, A. (1998). p40(phox): is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* **273**, 30097-30103.
- (18) GRIZOT, S.; GRANDVAUX, N.; FIESCHI, F.; FAURÉ, J.; MASSENET, C.; ANDRIEU, J. P.; FUCHS, A.; VIGNAIS, P. V.; TIMMINS, P.; DAGHER, M. C. Y PEBAY-PEYROULA, E. (2001). Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH-oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry* **40**, 3127-3133
- (19) GEIST, M.; DAGHER, M. C.; MOLNAR, G.; HAVASI, A.; FAURÉ, J.; PACLET, M.; MOREL, F. Y LIGETI, E. (2001): Characterisation of Rac GTPase activating protein (Rac-GAP): in human neutrophil granulocytes, *Biochem J* **355**, 851-858.
- (20) FAURÉ, J.; VIGNAIS, P. V.; DAGHER, M. C. (1999): Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem.* **262**, 1-12.
- (21) DELEO, F. R.; QUINN, M. T. (1996): Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukocyte Biol* **60**, 677-691
- (22) KOSHKIN, V.; LOTAN, O.; PICK, E. (1997): Electron transfer in the superoxide-generating NADPH oxidase complex reconstituted *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 139-146.
- (23) JENDROSSEK, V.; RITZEL, A.; NEUBAUER, B.; HEYDEN, S.; GAHR, M. (1997): An in-frame triplet deletion within the gp91-phox gene in an adult X-linked CGD patient with residual NADPH-oxidase activity. *Eur J Haematol* **58**, 78-85.
- (24) HORWITZ, M. E.; BARRETT, A. J.; BROWN, M. R.; CARTER, C. S.; CHILDS, R.; GALLIN, J. I.; HOLLAND, S. M.; LINTON, G. F.; MILLER, J. A.; LEITMAN, S. F.; READ, E. J.; MALECH, H. L. (2001): Treatment of chronic granulomatous disease with non-meloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *New Engl J Med* **344**, 926-927

- (25) BARESE, C. N.; GOEBEL, W. S.; DINAUER, M. C. (2004): Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther.* 4, 1423-34
- (26) GOEBEL, W. S.; DINAUER, M. C. (2003): Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Acta Haematol.* **110**, 86-92
- (27) QUINN, M. T. Y GAUSS, K. A. (2004): Structure and regulation of neutrophil respiratory burst oxidase: Comparison with nonphagocyte oxidase. *J Leukocyte* **76**, 760-781.
- (28) MILLER, F. J. JR. Y GRIENDLING, K. K. (2002): Functional evaluation of nonphagocyte NAD(P)H oxidase *Methods Enzymol* **353**, 220-233
- (29) PACLET, M. H.; COLEMAN, A. W.; BURRITT, J. Y MOREL, F. (2001). NADPH oxidase of Epstein-Barr-Virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b558 glycosylation. *Eur J Biochem* **208**, 5197-5208.
- (30) RAO, P. V.; MADDALA, R.; JOHN, F. Y ZIGLER, J. S. JR. (2004): Expression on nonphagocytic NADPH oxidase system in the ocular lens. *Mol Vision* **10**, 112-121

Revisión

La toxina botulínica como medicamento

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Este artículo es una revisión de las toxinas botulínicas, el compuesto orgánico más tóxico conocido de los que bastan 100 Kg, distribuidos equitativamente, para matar a toda la humanidad, por lo que se ha sugerido su uso como agresivo químico en la guerra y en el terrorismo. A continuación se describe la biología molecular de la toxina y sus mecanismos de acción.

Considera indicaciones terapéuticas las distonías, especialmente la laringea, la acalasia, el blefarospasmo, la esclerosis múltiple, los espasmos hemifaciales, procesos anales y por otro lado, su posible empleo para tratar los tics, la hiperhidrosis y las arrugas. Termina el trabajo con una amplia bibliografía del tema.

Palabras clave: Toxina botulínica.—Distonías.—Acalasia.—Arrugas.—Hiperhidrosis.

ABSTRACT

This article offers a complete revision of botulinic toxins, which are the most toxic among the organic compounds. Scarcely 100Kg equitably distributed are required to kill the whole mankind, and as a consequence its use has been suggested in conventional war or terrorisms. The molecular biology and the action mechanisms of the botulinic toxins are also described in this article.

In spite of the dangers, these toxins could be useful in therapeutic treatment of distonies, such as those from larynx, acalasy, blepharospasm, multiple sclerosis, hemifacial spasms, and on the other hand, for tic and wrinkles treatments.

Key words: Botulinic toxin.—Distonies.—Achalasia.—Wrinkles.

Una norma ética de la medicina ha sido la del “*primun non nocere*” y tradicionalmente a los medicamentos, se le exigía inocuidad y que hubiera una significativa diferencia entre dosis terapéuti-

ca y tóxica rechazando el empleo de tóxicos. Claude Bernard en 1885 en su "Introducción a la medicina experimental" había dicho que "los venenos pueden emplearse tanto para destruir vidas como para tratar a los enfermos". La toxina botulínica fue empleada en los años 60 para disgregar focos cancerosos. Al haber ordenado Nixon en 1968, cerrar la investigación con la toxina botulínica en Fort Derrick, Edward Schantz se fue a la Universidad de Wisconsin y allí dirigió su interés a la posible utilidad terapéutica de ésta, proporcionando a Allan Scott oftalmólogo del Smith-Kettewell Institut de Investigaciones Oftalmológicas de San Francisco muestras de toxina, que éste ideó en 1973 usarla como terapia relajante, demostrando que podía debilitar selectivamente a los músculos oculares de rhesus inoculando localmente cantidades mínimas de la toxina botulínica y luego a voluntarios con estrabismo, indicación que luego se amplió a muchos procesos. La toxina botulínica denerva funcionalmente a los músculos y como consecuencia induce la formación de nuevas uniones neuromusculares adyacentes, aliviando sustancialmente el dolor y mejorando la movilidad, siendo más eficaz, cuando se trata de músculos pequeños que sobre los grandes.

TOXINAS BOTULÍNICAS

Las toxinas botulínicas se designan con las letras BT seguidas del signo x y de una mayúscula expresiva del serotipo; vg la neurotoxina del Clostridium botulinum tipo A seria "BTxA" y mas comúnmente por las letras BoNT, seguidas, después de una barra inclinada, de una letra mayúscula indicativa del serotipo vg. BoNT/A; son las sustancias mas tóxicas existentes, incluidas las sintetizadas por el hombre. La cepa Hall, en un medio simple puede producir en 1 ml, diez millones de DL_{50} para el ratón en 24 horas. La dosis mínima que mata a un animal de laboratorio, generalmente el ratón de 20 g, en 24 horas, oscila según diversos autores entre 0,05 a 0,00005 mg/kg (la tetánica iría de 0,1 a 0,0001. La tarichatoxina 0,5, la batrachotoxina 4 y la saxitoxina 8. Un mg de toxina A contiene $31 \cdot 10^6$ DMM de ratón u $88 \cdot 10^6$ DL_{50} . Para el cobaya la DMM es $4,8 \cdot 10^6$. Un hombre muere con 100 a 3.500 DL_{50} ratón, es decir, con 5 a 160 mg/kg. La toxina botulínica es una de las potenciales sustancias que pudieran ser utilizadas como agresivo químico en guerra o en el terrorismo.

Para Gill y cols. (1982) y otros laboratorios basándose en la inoculación a varias especies, la DL_{50} para el hombre sería la de 1 ng/kg, y la letal 3 ng/kg (McNally y cols., 1994). Tomando como dosis letal para el hombre la de 0,065 mg por kg de peso 4,5 μ g de toxina botulínica mataría a un hombre y con 80-100 kg distribuidos equitativamente se podría matar a la humanidad. La LCt_{50} de la A es 22,5 μ g • min/ m_3 para el ratón y para el rhesus mientras que la de la enterotoxina B estafilocócica es 80-100 mg • min/ m_3 para el ratón. Por haberle caído una gota de toxina en la piel murió un Jefe de Servicio del Instituto Pasteur.

La toxina botulínica, como péptido, es relativamente termolábil ya que 80° C durante 30 minutos, o 100°C durante 10 minutos, separa sus cadenas H y L, con pérdida total de su toxicidad; una cocción prolongada evita la intoxicación. Resiste parcialmente hasta un pH de 2,5 y por ello a los jugos gástricos, y se descompone en un pH alcalino. La toxina se conserva muy bien a 0°C y a temperaturas inferiores, o bien liofilizada. La toxina se descompone en el aire, por la luz y por agentes químicos especialmente por los oxidantes, permanganato o yodo. La toxina tratada por el método de Ramón se convierte en la anatoxina o toxoide botulínico, mientras que si se somete a radiaciones (Levaditi) pasa a una supertoxina que llamó hipertoxina.

La toxina se obtiene cultivando el *C botulinum* en un medio nutritivo líquido durante unos días hasta el agotamiento de los nutrientes, que determina la muerte de las bacterias; se separan estas por centrifugación quedando las diversas presentaciones de la toxina en el sobrenadante.

Una mínima cantidad de neurotoxina que tiene 5-7S se segrega aislada pero la mayoría lo hace rodeada por una hemaglutinina, absorbible por hematíes sin que el conjunto pierda toxicidad, y por una proteína atóxica no hemaglutinante que rodea y protege a la neurotoxina de la degradación por los ácidos y por las proteasas, formando complejos y agregados extracelulares, lábiles en el ambiente y al calor con diferencias según las cepas, cuyo tipo depende del bacilo, de las condiciones de su cultivo y del solvente empleado (Sugii y cols., 1977). Los complejos M (inicial de "mean") son los menores, de 10-12 S; están constituidos por la unión de la neurotoxina con una molécula

atóxica no hemaglutinante. Los complejos L (inicial de "large") de 16S están formados por la unión del complejo M con la proteína b de 7,2S de 128.000 daltons, mas una gran cantidad de una proteína hemaglutinante (Das Gupta y cols. 1966), al menos en los complejos de las neurotoxinas A y D y probablemente en los de la B. La formación de complejos M o L depende mucho de la concentración de iones Fe^{++} ; si es de 1 mM los complejos M y L, se producen equimolecularmente, pero si la concentración es de 10 mM predominan mucho los M. La descomposición de los complejos, en otros menores aumenta la toxicidad al concentrarse en ellos la toxina.

Los agregados son macromoléculas que contienen como demuestra el microscopio electrónico una cadena de neurotoxina envuelta por una hélice de hemaglutinina (Boroff y cols. 1972). La adición de tripsina, al medio de pH 6,7 modifica ligeramente la estructura de los agregados, quedando más accesible la toxina.

La agregación dimérica de dos complejos L da un agregado tóxico de 19S (unos 900.000 daltones) en el caso de la BoNT/A y de 500.000 para la BoNT/B, y de unos 350.000 (11 S) para la BoNT/E. El agregado de 19S se retiene en las columnas de Sephadex de las que se puede eluir con cloruro sódico obteniéndose una fracción la α de 7,2 S con 150,000 d que es el 20% del total que contiene entre 3 a 5 veces mas neurotoxina que los cristales y poca hemaglutinina y la β que es el 80% que contiene poca neurotoxina y mucha hemaglutinina. La hemaglutinina se reparte en diversos picos, al modificar las condiciones de la elución (Das Gupta y cols. 1968).

Otro agregado es el formado por unión de los complejos M y L que forma cristales de 840.000 a 1.000.000 daltones, de unos 19S, salvo la BoNT/C₂ y laBoNT/G.

TABLA 1

Tipo	Composición
Complejo M	Toxina + proteína atóxica
Complejo L	Complejo M + proteína de 128.000 d + hemaglutinina
Agregados de L	
Agregados de M y L	

La diálisis de los agregados contra puffer fosfato separa los complejos M y la hemaglutinina, al menos en el caso de la neurotoxina A. La hemaglutinina puede separarse absorbiéndola con hematíes (Kozaki y cols. 1975).

La electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico separa las proteínas estabilizadoras de los agregados. Las columnas de Sephadex (dietilaminoetil) retienen a todas las proteínas de las soluciones de los cristales en un tampón de pH 7,2. La elución de la columna con el mismo tampón con gradiente de CINA separa dos fracciones: la a que contiene el 20% de las proteínas, entre ellas la mayoría de la neurotoxina, siendo, (Knox y cols. 1970, Lammanna y cols. 1970, Das Gupta y cols. 1966) tres a cinco veces más tóxica que los cristales y escasa cantidad de una proteína de similar peso, atóxica y no hemaglutinante. La ultracentrifugación de la fracción a da un solo componente de 7,2S de 128.000 (± 12.800) de pm y la gel filtración otro componente único de 150.000 daltons. Los cristales disueltos solución salina molar tamponada se resuelven en complejos L (Sugii y cols. 1975). La ultra centrifugación de la solución de los cristales en medio ácido solo da una banda pero en un pH alto aparecen varias bandas. La disgregación de los agregados en los que la toxina está protegida del pH ácido y de la pepsina, libera a aquella. Por ello, por ejemplo, la toxicidad aumenta, si el alimento se conserva a 0° C.

La neurotoxina se separa de los agregados y complejos, por el método rojo que comienza precipitando el producto bajando el pH, redisolviendo el precipitado en un buffer acuoso en el que al agregar sulfato amónico precipita la neurotoxina muy pura y estable en forma cristalina, que da una sola banda de precipitación con la anti-toxina por el método de Ouchterlony. La toxina se liofiliza y el polvo resultante se puede almacenar en viales pequeños. Hay también cristales formados por la neurotoxina unida a la hemaglutinina, y en algunos casos a otra proteína.

La neurotoxina se segrega como prototoxina que es un péptido lineal de 1.291 aminoácidos de 150.000 a 167.000 daltones (unos 5,7 S) para la de los *C. botulinum* A y B. Un puente disulfuro intracatenario, encorva a la cadena, dándole forma de "J". La activación a neurotoxina se produce por la separación de los dos extremos

de la cadena. Las proteasas SH-dependientes, como las bacterianas, la tripsina, pero no la quimiotripsina, cortan en un único punto a la prototoxina formando a partir del extremo C-terminal, una cadena H o pesada (de 97 a 105.000 daltones según el serotipo) que queda unida a la L o ligera (de 53 y 60.000 daltones) por unión no covalente y sobre todo por un puente disulfuro en la toxina A, que tiene una molécula de zinc y por dos en la toxina B. La reducción de los puentes disulfuro entre las dos cadenas separa dos fracciones con actividad antigénica diferente; la H de 104.000 d y la L de 59.000. La quimiotripsina separa en la holotoxina a la fracción H en dos partes una la H₁ de 50.000 d en la que radica la mayor actividad y otra de 100.000 d formada por la L y por la H₂, a la cual la tripsina separa la fracción H₂. Esta disposición de la toxina aumenta la neurotoxicidad. La toxina C₁ esta formada por dos proteínas no ligadas la I y la II.

La cadena H está constituida por la unión de una fracción llamada H₁ de unos 50.000 daltons en cuyo seno hay un puente disulfuro y la H₂ que se separa unida a la L, formando el complejo L-H₂, de unos 100.000 daltons, separables por la tripsina y por la quimiotripsina. Los pm de las subunidades H y la L son:

TABLA 2

<i>Tipo de toxina</i>	<i>Peso molecular de la cadena L (o fracción 1)</i>	<i>Peso miolecular de la cadena H (o fracción 2)</i>
A	53.000	97.000
B	59.000	104.000
Ca	53.000	98.000
D	60.000	110.000
E	50.000	102.000
F	56.000	105.000
G		

La destrucción o la reducción de los enlaces disulfuro con puffer de Nicotinadenina dinucleótido al 1% en solución de Cloruro sódico

0,5N o por el ditiotreitíol, suelta a las cadenas H que queden en el supernadante y a las L que se pueden separar por electroforesis en gel de acrilamida o bien dejando que se agreguen entre sí, precipitando cuando la concentración de toxina supera el mg/l salvo que, como pasa con la toxina tétanica, se adicione urea. La diálisis de una mezcla equimolecular de las cadenas H y L regenera el 40% de la neurotoxina.

Las neurotoxinas producidas por los clostridium, analizadas por clonación y secuenciación de genes, demuestra que tienen en común sólo algunos segmentos no consecutivos, localizados preferentemente en la cadena L. Las toxinas botulínica y tétanica tienen un segmento muy homólogo en la mitad de la cadena ligera (NH₂-terminal 50 k Da), que contiene el motivo ligado al zinc de la metaloendopeptidasas, HEXXH, que en cinco serotipos de la toxina botulínica, así como en la tétanica, quela al catión zinc, necesario para la catálisis. La HEXXH se ha sintetizado (Jongeneel y cols. 1989) actúa intracelularmente, lo que llevó a Schiavo y cols. (1992) a pensar que sería una endopeptidasa zinc-dependiente, cuya cadena L contiene la secuencia histidina-ácido glutámico-xaa-xaa-histidina típica de estas enzimas, que media la fijación a la proteína, siendo imprescindible para su toxicidad (Nieman y cols. 1994). Middelbrook y cols. demostraron que los inhibidores de las zinc-endopeptidasas bloquean la actividad intracelular de la toxina. Ello proporciona una prueba indirecta, pero muy convincente, de que la toxicidad celular radica en una actividad proteásica. Igualmente las cadenas L de las neurotoxinas tétanica y diftérica y la encefalina, que interviene en la inflamación y en la invasión y producción de metástasis de tumores malignos, así como en los subsiguientes procesos de reparación hística (proteasas de los PMN), son endopeptidasas zinc-dependientes, que cortan proteínas en puntos específicos.

Ihara y cols. (2003) demostraron que la neurotoxina de la cepa 111, la 111/NT, aislada de un caso de botulismo del lactante del serotipo B, tiene un 97,6% de homología y del 85,7% la de los aminoácidos con la neurotoxina de la cepa Okra aislada de un botulismo alimentario, diferencia que se traduce en cambios bioquímicos y antigénicos. La razón de sustitución de los no sinónimos respecto a la de los sinónimos fue 0,47. Las sustituciones de aminoácidos entre las toxinas 111/NT y Okra/NT tienen lugar preferentemente en

el dominio C terminal de la cadena pesada "H(C)" responsable de la unión con el complejo de proteína y gangliósido de su receptor.

Es posible que los Cl. botulinum A, B y E produzcan otras moléculas tóxicas de 9.000 a 18.000 daltones.

Se conocen cientos de inhibidores de las zincproteasas; el captopril inhibe específicamente la zinc-proteasa encargada de la conversión de la angiotensina en angiotensina, que abre vía para emplear antídotos.

Hay diversas toxitecas, siendo la más importante la del "American Type Culture Collection". Las tetraciclinas, los aminoglucósidos, espectinomocina, lincosamidas, polimixinas, penicilamina, quininas, bloqueantes de canales del calcio, acetilsalicílico, relajantes musculares, el ibuprofeno y la vitamina E potencian la acción de la toxina.

Las antitoxinas contienen anticuerpos contra ambas cadenas siendo los anti-H (constituidos por anti-H₁ y por anti-H₂) más potentes que los anti-L (Kozaki y cols. 1977, Krysinski y cols. 1980). Ambos anticuerpos son capaces de proteger al ratón frente a la neurotoxina. La BoNT/A y la BoNT/B sólo se neutralizan con sus correspondientes antitoxinas; la BoNT/D, la BoNT/F y la BoNT/E se neutralizan parcialmente con las antitoxina C y F.

GENÉTICA DE LA TOXICOGÉNESIS

Cada tipo de Cl. botulinum produce una neurotoxina principal, pero puede segregar otras en menor cantidad como la Af. La toxina se produce al expresarse los genes BoNT, de las toxinas A, B, E y G situados en plásmidos (Eklund y cols. 1988) en donde está también el gene de la toxina tetánica; los genes de las neurotoxinas A y B tienen un "open reading frame" de 3.873 pb que codifica la formación de una proteína de 1.291 aminoácidos que pesa 150.000 a 167.000 daltones (unos 5,7S) y tiene dos uniones sulfhidrilo intracatenarias. Los genes de las toxinas C y D están en el profago lisogénico llamado tox⁺. Algunos fagos tienen genes que codifican la toxina principal y otros fagos tienen genes que codifican otras toxinas menos específicas; la curación de una bacteria elimina un profago

pero no todos por lo que la bacteria continuará produciendo las otras toxinas; la ingeniería genética puede convertir un serotipo C en uno D o viceversa, o bien modificar la cantidad de toxina producida.

Para que se expresen los genes se requiere anaerobiosis, un pH superior a 4,6 (alimentos poco ácidos) y menos del 15% de sal. La adición de ornitina y citrulina aumenta la producción de toxina. También se requiere una temperatura superior a los 3°C. Para que una conserva sea tóxica si está a 10 a 20°C se necesitan varias semanas, mientras que a 28°C bastan 8 días; por eso los alimentos frescos no tienen suficiente toxina.

El calentamiento de las esporas a 70°C durante veinte minutos o bien adicionando a los cultivos de cepas C un suero antifago o naranja de acridina cura a algunas bacterias, perdiendo los genes BoNT. Los *C. botulinum* no toxigénicos pueden adquirir, si no tienen el fago tox+ la propiedad de fabricar toxina, incubándola con los lisados de un cultivo de bacilos toxigénicos estimulados por la Mitomicina C.

Las toxinas se sintetizan antes de que lo hagan las proteasas en las cepas que tienen estas enzimas y se producen a un pH bajo en el que se forma poco gas y pocas proteasas. Las cepas proteolíticas no forman toxina por debajo de pH 5 y con una concentración de cloruro sódico superior al 5%. La sal y los nitritos adicionados a los alimentos enlatados o en frascos, inhiben la producción de toxina.

Otros clostridia diferentes de los del botulismo pueden tener y expresar los genes codificadores de la neurotoxina botulínica y lógicamente podrían causar intoxicaciones botulínicas. Harvey y cols. (2002) describieron un caso de botulismo causado por la toxina F producida por un *Clostridium baratii*, y además los genes codificadores de las toxinas se pueden secuenciar, clonar e insertar en otras bacterias. (Eisel y cols. 1986, Fairweather y cols 1986, Hausor y cols. 1990, Binz y cols 1990, Binz y cols 1990, Thompson y cols. 1990, Whelan y cols 1992, Alison y cols. 1992, Campbell y cols. 1993), fabricando nuevos agentes productores del botulismo, aunque los experimentos de este tipo están prohibidos en muchas naciones entre ellas USA pero no hay prohibición internacional.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TOXINA BOTULÍNICA

La toxina libre, ingerida con los alimentos, se destruye parcialmente por la masticación. La toxina incluida en los agregados está protegida del pH ácido y de la pepsina. En el intestino la tripsina libera y activa a la neurotoxina, acción necesaria para la toxicidad de las toxinas E y G, sin que modifique la toxicidad de la toxina D. Colaboran, en menor grado a la activación, otras enzimas digestivas y las proteasas segregadas por el *Cl. sporogenes* y por los propios *Cl. botulinum* proteolíticos (los A y algunos B y F). Prévot y cols. (1966) en una epidemia por el tipo D en el Tchad, en 1959 encontraron que el *C. botulinum* estaba asociado al *Bacillus licheniformis*, cuya proteasa aumentaba la toxicidad (aunque no la causaba la adición). La reiteración de las tomas de toxina aumentan los efectos; es posible que se trate del fenómeno de facilitación observado en el tétanos.

La toxina libre dispersada en el aire en forma de aerosoles está muy expuesta a su degradación y si lo está en complejos, la toxina no se activa por los enzimas digestivos.

La toxina no se une a extractos de cerebro como obtuvo Wassermann Takaki en el tétanos, pero si se fija en los sinaptosomas (Habermann, 1974) que son terminales nerviosos, obtenibles experimentalmente del cerebro de ratón que conservan gran parte de la estructura de la presinapsis, entre ellas las vesículas; es decir necesita para fijarse no solo componentes bioquímicos sino además estructuras. La afinidad para los sinaptosomas no es muy grande pero permite estudiar la fijación de la toxina; Schlavo y cols. (1983, 1989) usaron pequeñas vesículas muy purificadas obtenidas de cerebro de rata. Para el efecto tóxico se requiere la holotoxina (al igual que en la tetánica TaTx) lo que no hacen las cadenas H y L separadas).

El anclaje se efectúa por el dominio, esférico del extremo carboxilo terminal de la cadena H de las holotoxinas, botulínica (al igual que pasa con las toxinas diftérica y tetánica) a los receptores que son un complejo de una proteína de unos 200.000 daltones, encontrada en 1996 por Middlebrook y col., expresadas en la membrana de células de feocromocitoma de rata diferenciadas en sentido neuronal por la inducción ejercida por el factor de crecimiento nervioso NFG, unida a un esfingolípido. Similarmente otras toxinas

microbianas como la diftérica, tienen dominios estructurales que se unen, internan y realizan la actividad enzimática. La toxina botulínica fijada, como ocurre en el tétanos, no se neutraliza por la IgG, por lo que no se evita el bloqueo de la liberación de la acetilcolina.

La cadena H recombinante obtenida por la clonación en la *E coli* de los genes de la toxina 111/NT tiene una actividad ligante a la sinaptotagmina II, 4,2 veces menor que la de la Okra/NT. El híbrido de los extremos COOH-terminal de las cadenas H de las dos toxinas revela que la disminución de actividad ligante se debe a la mutación de 23 residuos en esa fracción (1029 1291) de la Okra/NT (Ihara y cols. 2003).

Los receptores son específicos de cada serotipo de toxina (De Black y cols. 1986, Simpson, 1989); están situados en regiones especializadas denominadas “coated pits” traducibles como “pozos revestidos” que se presentan concentrados en la membrana de las presinapsis colinérgicas y sobre todo en la de las placas motoras amielínicas de las que hay 150 a 500 por cada mm² de membrana muscular dispuestos. Basta la fijación a los receptores de cantidades extremadamente bajas de toxina para provocar la enfermedad. La estructura de estos receptores determina la diferente susceptibilidad de las especies e individuos. Las drogas lisosomotrópicas inhiben o al menos retrasan la parálisis botulínica, lo que hace pensar, que la toxina entra en las neuronas por el RME, vía utilizada por otras toxinas bacterianas, por muchas hormonas polipeptídicas, por factores de crecimiento, e incluso por algunos virus (Goldstein y cols. 1979).

La toxina entrada en las neuronas emigra centrípetamente por los filetes nerviosos y llega por los pares craneales, a los centros nerviosos, a los nervios autónomos (colinérgicos) y a la función neuromuscular lo que explica la parálisis flácida de los músculos intrínsecos y extrínsecos del ojo y de los deglutorios. La toxina de la sangre, no atraviesa la barrera hematoencefálica.

La toxina botulínica no modifica la síntesis de acetilcolina, no modifica el número de vesículas, ni su contenido en acetilcolina, ni inhibe a la colinesterasa, y no forma anticuerpos contra la acetilcolina pero impide que se libere suficiente acetilcolina capaz de contraer al músculo. A concentraciones mayores puede inhibir la libe-

ración de otros neurotransmisores como la noradrenalina (Habermann y cols. 1987). A diferencia de la parálisis por el curare, la inyección directa de acetilcolina en el músculo para que llegue a la placa neuromuscular, o aún mejor la introducción por iontoforesis de tetraetilamonio contrae al músculo igual que si se hubiera aplicado una corriente eléctrica.

Una vez unida la cadena H a su receptor, otro dominio contiguo de la H reduce el puente disulfuro separando la cadena L que tiene actividad Zn-endopeptidasa, translocándola al citoplasma, en donde se une a lugares específicos de cada serotipo de toxina en las membranas de las vesículas colinérgicas; las neuronas que tienen neurotransmisores distintos de la acetilcolina como los órganos con inervación adrenérgica no se afectan y en aquellos con transmisión mediada por la norepinefrina y por la acetilcolina sólo se afecta ésta (Wright).

La neurotoxina B se une y corta a la sinaptotagmina, proteína asociada a las vesículas permitiendo que entre la cadena L en las vesículas (Nishiki y cols. 1994), lo cual no implica necesariamente que este fenómeno sea el que interne a la toxina.

La neurotoxina A separa sólo nueve aminoácidos, menos del 5% de la porción carboxiterminal de la SNAP-25, esenciales para la neuroexocitosis. La toxina E la corta en otro punto, e igualmente impide la exocitosis.

Las dos isoformas de la sinaptobrevina proteína de la membrana de las vesículas, cuya motilidad electroforética es de 19K son cortadas (Schlavo y cols. 1992) al igual que lo hace la toxina tetánica, produciendo fragmentos de 12 y de 7 K en el topo y en el hombre, por las toxinas botulínicas B y F y por la tetánica, separando la glutamina de la lisina, la D hidroliza el enlace peptídico entre la lisina y la leucina. Las toxinas B, D y F en el ratón y en el pollo, cortan a la isoforma 1 a nivel de la valina y la de la 2 entre la glutamina y la fenilalanina; la eliminación de los extremos de la sinaptobrevina del SNAP-25, o de la sintaxina, impide que se una la vesícula a la membrana presináptica y la consiguiente exocitosis, lo que explica en parte la alta resistencia del ratón y del pollo y la baja del topo y del hombre en lo que interviene la diferente presencia de receptores de alta afinidad para las toxinas en la unión

neuromuscular. Al tratarse de una enzima catalítica, una sola cadena L puede cortar sucesivamente todas las moléculas de sinaptobrevina, de SNAP-25 o de la syntaxina, existentes en la terminación nerviosa, bastando menos de una molécula de toxina por célula para provocar la enfermedad y su persistencia pese a cesar el ingreso de toxina. La cadena L de cada serotipo como endopeptidasa actúa sobre una proteína SNARE o lo hacen sobre la misma proteína pero cortándolo en puntos diferentes, formando un complejo hetero-oligomérico, asociado con la membrana de las vesículas sinápticas con una parte exterior a las mismas, que impide la exocitosis.

La entrada de la cadena L en las vesículas, acidifica su contenido, gracias a la bomba protónica ATPásica de la membrana hasta un pH de 4,5. Algunas drogas o las aminas lisosomotrópicas, impiden la disminución del pH y casi siempre, inhiben la liberación de ligandos, hecho que es un marcador de endocitosis mediada por el receptor (1955).

El calcio de las vesículas se une a dos histidinas del segmento central conservado de la cadena L, como se preveía por su homología con las zincproteasas, impidiendo la acción del calcio sobre la membrana de las vesículas presinápticas inhibiendo, aún a concentraciones mínimas, la salida de acetilcolina de las vesículas, quedando interrumpida la transmisión nerviosa entre las neuronas motoras y muy selectivamente en la placa neuromuscular (Brin, 1997), causando parálisis flácida de los músculos inervados por el sistema nervioso periférico, como se ve en el preparado frénico-diafragma de rata o ratón y se altera la transmisión parasimpática.

Las proteínas GTP son el blanco intracelular preferido de las toxinas proteicas bacterianas. Las Rho GTPasas RhoA/B/C, Rac1/2 y la Cdc42 pertenecen a la superfamilia Ras de bajo pm, son las principales reguladoras del citoesqueleto de actina.

Las toxinas A y B del *Clostridium difficile*, causantes de la colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos son citotoxinas que actúan intracelularmente con las mono glicosiladas Rho GTPasas.

La toxina C3 del *Clostridium botulinum*, que no está relacionada con las neurotoxinas clostridiales, cataliza la ADP ribosilación de la RhoA/B/C pero no la de otras Rho GTPasas. La glicosilación así

como la ADP ribosilación inactiva al Rho disociando el citoesqueleto actínico (Just y cols. 2001).

En el caso de la toxina C_1 inyectada en un asa aislada de ratón, se une su componente II a la superficie de la células intestinales y hace que entre el componente I al interior de la célula (Ohishi, 1983), haciendo que se acumule líquido en el asa.

Al quedar inhibida la liberación de acetilcolina disminuyen los potenciales miniatura y el de placa causando parálisis muscular. La repetición del estímulo restablece el potencial de acción muscular (fenómeno de facilitación), lo que asemeja el modo de acción de la toxina al exceso de Mg o a la gran hipocalcemia o al bloqueo neuromuscular que causan algunos antibióticos o al síndrome de Lambert-Eaton. El veneno de la viuda negra aumenta la salida espontánea de calcio del músculo intoxicado por la toxina botulínica, pero no basta para restaurar la liberación normal de la acetilcolina lo que confirma que no es la concentración del calcio, sino su intervención en la exocitosis, como actúa la toxina botulínica. El estímulo repetitivo del nervio ulnar con 3 Hz no señala cambio de la amplitud, en el test de conducción nerviosa, mientras que el de 20 Hz señala un aumento mayor del 160%.

La microinyección de toxina en los pares de neuronas del ganglio bucal del molusco marino, *Aplysia californica*, bloquea la neuroexocitosis, efecto que requiere zinc.

La inyección de una mínima cantidad de toxina selectivamente en un músculo, lo debilita y atrofia por irreversible bloqueo de la liberación de acetilcolina en la placa motora efecto que persiste 2 a 20 días y que se restablece al cabo de 2 a 4 meses cuando una nueva terminal axónica haya restaurado la transmisión (Alderson y cols. 1991).

Para la curación es preciso que se inactive la toxina, y una vez logrado la célula debe sintetizar nuevamente su dotación de proteínas sinápticas dañadas por la toxina.

La toxina disminuye los potenciales miniatura, atrofia por denervación al músculo; las estimulaciones repetidas pueden hacer reaparecer un potencial de acción muscular (facilitación).

El efecto depende de la especie intoxicada, de la dosis total y de su reparto temporal y de los músculos afectados, siendo los oculares

los más sensibles. Una dosis dada administrada fragmentadamente es mas tóxica que si se hace de una vez.

La afectación postsináptica es secundaria; se producen lesiones de denervacion atrofia muscular alteraciones eléctricas. Debido a la mínima cantidad de toxina que normalmente entra en el organismo y que enseguida se fija sin que llegue a contactar con las células presentadoras del antígeno, como pasa con el tétanos, no produce anticuerpos.

La toxina tetánica también impide la salida de acetilcolina pero lo hace en la interneurona inhibidora lo que explica que en el tétanos la parálisis sea espástica, al estar interrumpido el circuito nervioso espinal que proporciona el adecuado equilibrio de la contracción de músculos opuestos, esencial para un movimiento armónico y controlado de las articulaciones.

USO TERAPÉUTICO DE LA TOXINA

En 1989 la FDA aprobó la toxina como “orphan drug” y autorizó hacer ensayos con un lote certificado de 200 mg fabricado en 1979 con la cepa Hall. La toxina se valora en nanogramos y más frecuentemente en unidades funcionales, es decir, su contenido en dosis letales medias para el ratón Webster de 18 a 20 g. La toxina más usada es la A aunque puede emplearse la B sobre todo si se desarrollan anticuerpos contra la A, mientras que la toxina F sólo tiene la mitad de eficacia que la del tipo A. La toxina botulínica A está comercializada bajo el nombre genérico de “botox®” procedente de USA, comercializada en viales con 0,5 ml de albumina humana y 0,5 ml de SS. El Laboratorio Allergan la obtiene bajo el nombre de Vistabel que por microfiltración y selección de las partículas de mayor tamaño enlentece la difusión de la toxina Botox. Otro preparado similar es el ingles Dysport ®. Si está liofilizada se recompone con solución salina, estéril sin conservantes y se debe inyectar antes de cuatro horas, manejándola cuidadosamente, ya que es termolabil y sensible a la agitación. Se van inyectando 0,1 a 0,5 ml de la solución, según el tamaño del músculo, de debilitación deseada y de la preparación comercial de la toxina. La cantidad que se inyecta es muy pequeña, varios nanogramos. Se mide en unidades funcionales,

que se corresponden a la dosis letal media para el ratón Webster de 18 a 20 g. Se inyecta en varias zonas de los músculos hipertrofiados o que se contraen activamente a la palpación. Al tratarse de productos importados, las toxinas son caras, unos 400 euros cada tratamiento medio. En general se suelen inyectar 0,1 a 0,5 ml de la solución, según el tamaño del músculo, del grado de debilitación requerido y del preparado comercial. Se inyecta en varias zonas de los músculos afectados. El efecto se manifiesta al cabo de unas horas, siendo máximo hacia los 20 días, pero al irse regenerando las sinapsis, cesa el efecto curativo de la toxina por lo que se debería reinyectar cada tres o cuatro meses para contrarrestar la hiperactividad de las sinapsis neoformadas, que restablecen el hiperestímulo de la placa motora. Aún cuando se recomienda poner la siguiente inyección no antes de seis meses aunque en algunas indicaciones se repite a los dos meses, desde los 25 a los 75 años. En el 2% de los casos la toxina no da resultado bien por mala técnica en su aplicación, por dosis insuficientes, por haberse alterado el producto o improbable por la producción de anticuerpos.

CONTRAINDICACIONES

La toxina botulínica está contraindicada en los pacientes con enfermedades neuromusculares como la miastenia gravis, la esclerosis lateral amiotrófica, en el síndrome de Eaton-Lambert ni en otros trastornos generalizados de la función muscular. Aunque no se han señalado efectos negativos, está clasificada como fármaco tipo C; no se debe administrar a embarazadas ni a madres lactantes. Si en los siete días anteriores se han inyectado tetraciclinas, aminoglucósidos, espectinomicina, lincosamidas, polimixinas, penicilamina, quininas, bloqueantes de canales del calcio, acetilsalicílico, relajantes musculares, ibuprofeno y vitamina E que potencian la acción de la toxina, debe demorarse la administración de ésta, así como si hay inflamación o infección en el punto de inyección, ni en pacientes en tratamiento con aminoglucósidos u otros fármacos que pueden interferir con la unión neuromuscular. No se ha encontrado toxicidad a largo plazo. Al ser ínfima la cantidad que se debe inyectar para la terapia no resulta peligrosa para los manipuladores que no necesitan ser vacunados.

El 10 al 15% de los tratados durante varios años, sobre todo si se administran dosis superiores a las necesarias para bloquear la sinapsis, el exceso pasa a sangre y puede afectar a sinapsis lejanas y estimular el sistema inmune, produciendo antitoxinas que disminuyen hasta anular el efecto, por lo que se deben utilizar las menores dosis capaces de cortar la liberación de acetilcolina, y ponerla en el sitio correcto. La dosis depende de cada grupo muscular y hay un rango en la dosis eficaz. Por ejemplo, para el blefaroplasmo la dosis es de 20 a 40 unidades. Para el esternocleidomastoideo de 75 a 1.440 U. A las dos semanas se ha producido alivio del dolor y mejora funcional. La inyección se realiza directamente en el músculo hiperactivo con una jeringuilla muy pequeña y una aguja muy fina. Se aplicarán los pinchazos necesarios en cada caso; para el blefaroplasmo varios en torno a los ojos en los párpados, en las cejas. La toxina debilita sin anularla la función de los músculos inyectados sin afectar a los vecinos. Normalmente, hay que repetir el tratamiento porque el efecto dura sólo entre cuatro y seis meses, debido a la producción de nuevas sinapsis hiperactivas. Aunque la cantidad es muy baja los viales desechados y vacíos, las jeringas o cualquier material que haya contactado con la toxina botulínica deben autoclavarse o ser tratados hipoclorito al 0,5% y los derrames recogidos con un paño absorbente empapado en hipoclorito.

EFFECTOS ADVERSOS

El pinchazo casi siempre cuando fue incorrecto, puede causar localmente hematoma, edema, dolor y eritema que desaparecen pronto. La toxina purificada no irrita ni causa inflamación. Las molestias locales dependen del volumen inyectado, de la concentración de la proteína y del pH de la solución. En el músculo puede aparecer atrofia, que repercute en debilidad y a veces fatiga generalizadas, sin necrosis muscular. No se ha publicado ningún efecto adverso a largo plazo durante los doce años que se está empleado. La cantidad inyectada es mucho menor que la que podría causar lesiones sistémicas y queda en el lugar de la inyección; en algunos casos se han presentado náuseas, vómitos, cefaleas, fatigas, trastornos y dificultad de la deglución, diplopia pasajera, disfagia, debilidad muscular, síntomas gripales, incontinencia urinaria y somnolen-

cia. Además la toxina que queda fuera de un músculo es degradada en pocas horas, de modo que no entra en contacto con el hígado, el riñón o el corazón, salvo si se inyectaran varios cientos de unidades que podrían producir parálisis neuromuscular en zonas alejadas, que si fueran los músculos respiratorios, requerirían respiración asistida, y sólo se sabe de algunos casos de diplopia pasajera, disfagia o debilidad muscular. Debido a la escasa cantidad introducida, a su fijación local y a su degeradación catabólica hace que sólo se produzca una sensibilización alérgica en el 2,6% de los casos, de la piel o generalizada, incluso anafiláctica que puede ser grave o una respuesta inflamatoria. La rara producción de anticuerpos neutralizantes de la toxina botulínica reducen la eficacia de las siguientes aplicaciones.

El Servicio de rehabilitación del Hospital Txagorritxu de Vitoria utiliza este protocolo para el consentimiento informado de los pacientes que van a recibir la toxina botulínica. Identificación. Médico informante. Fecha. INFORMACIÓN SOBRE LA TOXINA BOTULÍNICA: A Indicaciones: enfermedades que producen contracción mantenida de determinados músculos (Espasticidad) como trombosis o hemorragias cerebrales, parálisis cerebral, traumatismo cráneo-encefálico, esclerosis múltiple, tortícolis espasmódica, espasmo de media cara, espasmo de los párpados, etc.

Se aplica por vía intramuscular y su efecto dura de 2-4 meses. B: Alternativas: Aunque el equipo que le trata considera que en su caso concreto ésta es la mejor opción, existen otras posibilidades de tratamiento como son fisioterapia, medicación oral, bloqueos nerviosos, medicación intratecal, cirugía. C: Riesgos y complicaciones relativos a la indicación médica de espasticidad: En general las complicaciones se producen en los días siguientes a la inyección y tienen carácter transitorio. Efectos locales: El más frecuente es la debilidad muscular con posible aumento de caídas. Dolor localizado.

Sensibilidad y/o hematoma en el lugar de inyección. Dificultad para tragar.

Efectos sistémicos: Síntomas gripales. Reacciones alérgicas graves Fatiga excesiva. Debilidad muscular generalizada. Incontinencia urinaria. Vómitos. Somnolencia.

En caso de sobredosis puede producir parálisis neuromuscular distante y profunda. Si causara parálisis de músculos respiratorios, sería necesario respiración asistida.

Riesgos relacionados con sus circunstancias personales específicas.

Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda, no tenga reparo en preguntarnos.

E. Declaro: Que he sido informado por el médico de las ventajas e inconvenientes del tratamiento y de que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.

He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para que se me administre la toxina botulínica. Firma del paciente. Firma del médico responsable de la información y en su caso representante legal.

La toxina botulínica se puede utilizar para tratar una serie de enfermedades oftálmicas, neurológicas, digestivas, urológicas e incluso cosméticas, aunque hay que ser prudentes al establecer resultados especialmente a largo plazo. Entre las indicaciones tenemos:

DISTONÍAS

Hay una amplia patología debida a la hiperactividad de la placa neuromuscular que causa distonías, que son síndromes caracterizados por la presentación de espasmos o contracciones intermitentes o más frecuentemente sostenidas de los músculos, que tienen aumentada su tensión y llegan a hipertrofiarse, a contraerse activamente al comprimirlos y a menudo causar dolor, torsiones, espasmos musculares dolorosos, rigidez y alteración del sueño, posturas anómalas que determinan impotencia y hasta anquilosis, rebajando la calidad de vida. Se deben a la afectación primaria de los ganglios basales especialmente del núcleo lenticular y del tálamo que excita al cortex desde donde parten los estímulos positivos sobre la placa muscular. La espasticidad puede afectar a cualquier músculo voluntario siendo frecuente en muchas enfermedades neurológicas de

adultos y niños. Las distonías se pueden clasificar por su repercusión sintomática, por la edad de inicio y sobre todo por los músculos afectados, de modo que puede ser focal, cuando afectan a un grupo limitado de músculos en alguna parte del cuerpo, la segmentaria cuando lo son dos o más grupos musculares contiguos y generalizada cuando abarcan a todos los grupos musculares, como la Distonía musculorum deformans, las enfermedades de Wilson, de Huntington, la de Hallervorden-Spatz y la Ataxia-telangiectasia.

La mayoría de las distonías son focales, afectando sólo a un área del cuerpo, como los ojos, una mano, el cuello o las extremidades; pueden ser extensa, como la distonía del cuello y los brazos, o bien ser multifocal, afectando a una extremidad superior y otra inferior del mismo o contrario lado o generalizada a todo el cuerpo. El calambre del escritor (o del músico) es una distonía focal en la que están contraídos temporalmente los músculos de la mano y del brazo durante la escritura, o al tocar algunos instrumentos similares, acto que a través del estrés de los movimientos repetitivos de la mano (favorecido por el cansancio psicológico) desencadena el espasmo. Otra distonía de las manos es la "mano talámica".

En las distonías no complicadas, se mantienen normales la conciencia y las funciones sensitivas e intelectuales. La distonía desaparece en el sueño y disminuye con la sedación, mientras que aumenta en los estados de tensión. Se ha descrito la presencia de mutaciones genéticas ligadas casi siempre a la distonía generalizada. La enfermedad de Wilson es una degeneración hepato-lenticular; la distonía suele aparecer en la infancia afectando a un pie o una pierna que luego suele afectar a otras partes del cuerpo. La mayoría de los casos son esporádicos pero algunos casos se deben a mutaciones de alguno de los cinco genes dominantes autosómicos; hay una distonía relacionada con una mutación genética es la que aparece en el parkinson mientras que otras tratable con dopa se acompaña de rigidez semejante a la del parkinson que comienza en infancia o en la juventud. En algunos casos existen antecedentes familiares de temblores de cabeza o manos. En algunos pacientes se han identificado lesiones del cerebro por anoxia por parte o fetales o del recién nacido o por microtraumas; algunos casos de espasticidad se han relacionado con microlesiones debidas a esclerosis múltiple, a encefalitis, a parálisis cerebral, que puede deformar el tronco y extremidades cau-

sando pie equino o a trombosis o hemorragias cerebrales, a esclerosis múltiple, o a traumatismos craneales o a otras enfermedades subyacentes a la exposición a drogas.

Las distonías afectan a 1 de cada 20.000 personas (se estima que en USA hay entre 50.000 a 100.000 pacientes), proporción que varía mucho para cada tipo de distonía y con el criterio diagnóstico, teniendo en cuenta que hay muchos casos leves que no se diagnostican y en otros que sólo lo son retrospectiva o tardíamente, habiéndose calculado que la distonía se diagnostica al cabo de 4 a 10 años (2 a 5 para la achalasia) de haber aparecido los síntomas. Es más frecuente en las mujeres, hasta tres veces más, en el caso del blefarospasmo, y entre los 35 a los 50 años. La mayoría son esporádicos habiéndose identificado al menos cinco genes implicados en su presentación; un pequeño porcentaje se debe a traumas o aparece como efecto secundario de algunos medicamentos. Por otro lado tenemos distonías generalizadas como las que afectan a las personas que han sufrido parálisis cerebral.

Los tratamientos clásicos de las distonías son prácticamente de apoyo, pues son poco eficaces y duraderos y causan importantes reacciones adversas, en algunos casos graves. Los anticolinérgicos y los relajantes musculares son poco eficaces en las distonías focales. Se intentó bloquear la excitación del cortex mediante estímulos eléctricos. En espera de una prevención causal de tratamiento de la distonía y la de sus consecuencias se basa en impedir que la acetilcolina liberada por las terminaciones presinápticas sigan estimulando a los músculos por medio de la toxina botulínica inyectada, en cantidades ínfimas en los músculos contraídos. Las técnicas de microinyección y el uso de guías para colocar la aguja mejorará la precisión del lugar de la inyección y de la dosis, reduciendo la variabilidad de los efectos. La electromiografía puede aclarar cuáles son los músculos afectados en las distonías laríngeas, las de la mano, raramente en las del cuello, pero puede confundir en las demás distonías. Si hay disfagia la dieta debe ser blanda por el riesgo de aspiración.

DISTONÍA CERVICAL O TORTÍCOLIS ESPASMÓDICO

Es la distonía focal más común. Se debe a contracciones espasmódicas de los músculos de un lado del cuello que puede extenderse al hombro haciendo que la cabeza rote fijándose hacia un lado, hacia atrás o hacia abajo acompañándose de dolor. Hay escalas como la del "Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating" (TWSTRS) que tiene en cuenta la excusión máxima, dirección que toma la cabeza, el grado de rotación de ésta y del mentón. El 10% de los casos remite espontáneamente antes de un año, pero hasta el 87% de estos recaen en el siguiente año. Puede ser una manifestación de una distonía musculorum deformans.

La DC se trata con terapia física y bio-retroalimentación, con escasos resultados. Los tratamientos quirúrgicos comprenden lesiones estereotácticas, la miotomía del esternocleidomastoideo, la denervación periférica y el estimulación de la médula espinal (Shima y cols. 1988), generalmente producen beneficios modestos y pueden originar lesiones irreversibles. Se ha sugerido la talamotomía bilateral pero puede alterar el lenguaje. Los medicamentos empleados son los anticolinérgicos, las benzodiazepinas, el baclofeno, los neurolépticos, los antidepresivos tricíclicos y los depleccionadores de dopamina. Para Gauthier (1986), el 39,5% logra un beneficio significativo con anticolinérgicos, el 11% con baclofeno y el 21% con clonazepam, beneficio que queda a menudo sin efecto por la presentación de reacciones adversas.

Como las demás distonías focales, el tratamiento de elección de la distonía cervical es la toxina botulínica que alivia siempre el dolor y mejora la incapacidad funcional en el 65% de los casos. Antes de tratar a los enfermos debe determinarse los músculos que más contribuyen a la postura.

La toxina se inyecta en diferentes puntos de uno o más músculos que producen la desviación del cuello. La mejoría se aprecia entre el primer y el tercer día, manteniéndose entre 1 y 6 meses, por lo que hay que repetir las aplicaciones al menos pasados dos meses y mejor seis meses ajustando la dosis según los resultados de las anteriores tandas. Como reacciones adversas específicas de esta indicación tenemos la paresia de los músculos afectados, con debilidad del cuello,

disfagia o dificultad para deglutir en el 10% de los tratados que puede hacer necesaria la sonda nasogástrica y babeo.

El medicamento que da mejores resultados es la toxina botulínica en los músculos afectados (1990), introducida en 1984. Se inyecta un máximo de 200 U de toxina en los músculos del cuello que desvían al mismo, sin pasar de 50 U por músculo si se inyecta en dos y de 0,25 ml si se hace en tres músculos; a partir de las 20 horas a 3 días se aprecia mejoría que se mantiene entre 1 y 6 meses, pudiendo repetirse la pauta ajustando la dosis la eficaz de acuerdo con lo observado en la primera aplicación. El dolor se alivia siempre y la incapacidad funcional mejora en el 60 a 70% de los casos.

Las reinyecciones después de al menos dos meses puede ajustarse la dosis según los resultados de la primera pauta sin sobrepasar las dosis adecuadas.

PARÁLISIS ESPÁSTICAS

La toxina está indicada en los músculos espásticos de las cuatro extremidades, secuelas de la esclerosis múltiple y sobre todo de la parálisis cerebral, proceso que causa subnormalidad y deformidades muy invalidantes. El 10% se debe a anoxia al nacer y por ello es más frecuente en prematuros, pero la mayoría de los casos se debe a procesos perinatales. Su prevalencia es de unas 1.200 personas por cada 10^5 (1). La incidencia en el RU es de 250 por 10^5 nacidos vivos. La toxina botulínica inyectada en los músculos flexores del brazo y antebrazo rebaja su tonicidad, aumenta la amplitud de los movimientos y la función de las extremidades. Es un tratamiento muy efectivo y seguro para disminuir la contractura muscular, reducir la espasticidad y mejorar las funciones motoras. En la hemiplejía se puede inyectar intramuscularmente previa sedación, ya que las inyecciones son dolorosas 4 a 6 U/Kg con máximo de 15 sin sobrepasar las 1.000 U en cada paciente, en los músculos contraídos del miembro o miembros afectados, que facilita la limpieza por los cuidadores, la escritura y la manipulación de objetos durante 3 a 6 meses. La pauta se puede repetir a los dos meses. El tratamiento debe comenzarse antes de que se hayan producido acortamientos de los músculos y de los tendones, reduciendo las indicaciones quirúrgicas.

LUMBAGIA CRÓNICA

La toxina botulínica reduce al menos a la mitad el dolor durante una media de 6 meses. Foster y cols. (2001) encontraron en 31 pacientes que, a las 8 semanas, se redujo el dolor al menos un 50% (evaluado por escala analógica visual) en el 60%, mientras que en los no tratados fue de 12,5% ($p = 0,0009$). La mayoría de las escoliosis y de otras deformidades vertebrales se deben a distonías de los grandes músculos vertebrales para los que la toxina podría ser útil.

ESPASMO HEMIFACIAL

Se debe a la contracción irregular de los músculos de un lado de la cara. En realidad no es una distonía: con frecuencia se debe a una inflamación. La toxina botulínica reduce en un 95% la intensidad del dolor, y mejora en un 90% la movilidad y en un 94% el dolor de los pacientes con distonía cervical; la variación en la escala de Columbia permite objetivar la eficacia de la toxina botulínica.

DISTONÍA LARÍNGEA

O disfonía es la distonía focal que afecta a los músculos laríngeos con espasmo de las cuerdas vocales que dificultan el habla. La electromiografía podría ayudar a delimitar las zonas de mayor actividad de las cuerdas. Se trata inyectando una pequeña cantidad de toxina en los músculos contraídos. Algunos preconizan hacer electromiografía mientras que para otros puede dar resultados incorrectos. Una posible indicación es la de relajar al músculo de la vejiga urinaria cuando se requiere cateterismo, para soslayar la obstrucción debida a una contracción muscular intensa.

El síndrome de Meige es la distonía orofacial, u oromandibular, debida a la contracción irregular de los músculos de la parte inferior de la cara.

BLEFAROSPASMO

Es el cierre involuntario de uno o de ambos párpados, por hiperactividad de la placa motora de los músculos extrínsecos del ojo, contrayéndolos durante unos minutos a varias horas, causando ptosis palpebral. Se desencadena por una situación ansiosa o por el estímulo de la luz solar, o por el contacto con los párpados; la contracción se extiende a veces a los músculos de las mejillas y de las cejas. Fue atribuido a una alteración psíquica. En los casos graves, el paciente no puede parpadear y tiene que abrirse los ojos con las manos para poder ver. Los primeros síntomas suelen aparecer a los 50 ó 60 años.

En 1973 el oftalmólogo americano Alan Scott del Smith-Kettewell Institut de San Francisco ideó usar la toxina botulínica como terapia relajante en el blefarospasmo, basado en que debilitaba los músculos oculares de primates al inyectar localmente cantidades ínfimas de toxina botulínica intramuscularmente. La toxina es efectiva en el 80% de los casos y es de elección en este proceso. Para el blefaro espasmo unilateral se inyecta 0,05 a 0,1 ml (1 ml contiene 200 U) en varios puntos de los orbicularis oculi pretarsal medio y lateral del párpado superior y en el orbicularis oculi pretarsal lateral del párpado inferior con un total de 1,25 a 2,5 U, hace mejorar mucho los síntomas en el 98 de los casos. Las inyecciones se repiten cada 3 meses, pudiendo disminuirse la dosis o aumentarla hasta duplicarlas si la respuesta fue insatisfactoria, sin exceder las 100 U cada tres meses. Rara vez puede causar doble visión o sequedad ocular que desaparecen con el tiempo. Dosis superiores a las indicadas pueden presentarse efectos secundarios transitorios como la ptosis, hecho que se debe tener en cuenta en posteriores administraciones inyectando menor cantidad de toxina. La toxina A ha desplazado a la cirugía y a la farmacología que sólo producían beneficios marginales y algunas veces acarreaban importantes efectos secundarios.

ESTRABISMO

En 1971, Alan Scott después de haberlo estudiado en monos, trató el estrabismo inyectando la toxina botulínica en los músculos extraoculares en mayores de 12 años, 1,25 a 5 U con un volumen

máximo de 0,15 ml por músculo. Luego aplicaron este tratamiento Roggenkaemper en Dressler, Benecke en Alemania y Poewe y Auff en Austria. Andériz y col. (1999), entre otros, prefieren la toxina a la cirugía clásica para tratar la esotropía congénita. Scott en 1980 la empleó con control EMG audible, con dosis de 2,5 U, 3,75 U y 5 U según el ángulo de desviación, en una y en algunos casos dos aplicaciones. El tratamiento mejora la mirada cruzada de los pacientes, reduciendo la desviación horizontal media previa de 47,89 a la de 14,8, aunque puede ocasionar ptosis, hiper e hipotropías. Resultados similares son obtenidos por Mc Neer y cols. (1994) y por Gómez de Liaño y cols. (1996). Su utilidad parece mayor en la esotropía congénita en los 3 primeros años de vida, aunque la mayoría necesitó tratamiento quirúrgico.

ESPASTICIDAD BRAQUIAL

No está autorizado explícitamente el empleo de la toxina en esta distonía, que suele deberse a ictus. Es útil la inyección de 1.000 U de toxina distribuidas en los flexores común profundo y superficial de los dedos, en el cubital anterior, palmar mayor, y bíceps braquial, repitiendo la pauta cada 4 meses pero no antes de los dos meses.

PIE EQUINO

En esta y en otras deformidades del pie causadas por parálisis cerebral o por poliomielitis, las inyecciones locales de toxina debilitan a los músculos hiperactivos, disminuyen la espasticidad y mejoran sensiblemente la marcha al menos durante tres 3 meses con menos efectos adversos que las tablillas correctoras. La toxina no se debe aplicar hasta pasados los dos años.

ACHALASIA O ACALASIA

Es la distonía debida a la contracción permanente de la musculatura esofágica, generalmente del esfínter inferior, dificultando el tránsito alimenticio hacia el estómago, sin relajarse en respuesta a

la deglución, causando pérdida del peristaltismo con el consiguiente estasis de los alimentos y dilatación esofágica a la que se debe la mayoría de los síntomas. Fue descrito por Thomas Willis en 1679. Su incidencia al menos en EEUU y Europa es de 5 a 10 por 10⁶ habitantes (Wong y cols. 1989, Veme y cols. 1997. Niwamoto y cols. 1995) pensaron que podría deberse a un herpes virus humano o al del sarampión que negaron Birgisson y cols. (1997) al no haberlo visualizado en los plexos nerviosos ni en las neuronas del ganglio del vago; sí se han hallado anticuerpos anti-neurona entérica por Veme y cols. (1997). Sea cual fuere su causa, la base patogénica radica en la pérdida de neuronas en el plexo mioentérico del esfínter esofágico inferior, y en la degeneración de las células ganglionares que se rodean de leucocitos especialmente de eosinófilos (Goldblum y cols. 1994, 1996). La pérdida de neuronas en la región del esfínter esofágico inferior impide la relajación muscular, con aumento de presión sobre el esfínter.

La disfagia funcional es el síntoma más frecuente y está presente en el 97% de los pacientes (Moreno y cols. 1988, Desa y cols. 1990). Aparece al deglutir alimentos de diversa consistencia. Se puede lograr el paso de los alimentos retenidos, extendiendo los hombros y la cabeza hacia atrás, colocando los brazos detrás de la cabeza, realizando la maniobra de Valsalva, tragando repetidamente o ingiriendo líquidos. Una amplia mayoría de pacientes sufren de regurgitaciones que a menudo se confunden con las del reflujo gastroesofágico, que frecuentemente coexiste con la acalasia, pero el producto regurgitado no es ácido, ya que no procede del estómago. Es frecuente que la regurgitación se produzca durante el sueño favoreciendo la presentación de neumonía aspirativa, de absceso pulmonar y de bronquitis crónica. La tercera parte de los casos experimentan dolor torácico que suele irradiarse al cuello, hombros, brazos y espalda, que lleva a limitar la ingesta. El lactato producido por la fermentación anaerobia de los alimentos irrita al esófago y causa pirosis. Campos (1990) encontró en 27 pacientes con acalasia tratados en el Hospital Calderón Guardia estos síntomas cuya proporción depende de la antigüedad del proceso, de la observación detenida que se lleva en los hospitales, etc.

TABLA 3

<i>Síntoma</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Síntoma</i>	<i>Porcentaje</i>
Disfagia	100	Vómitos	52
Dolor torácico	44	Pérdida de peso	41
Reflujo	30	Epigastralgia	30
Tos	22		

El tratamiento se basa en la dilatación por un balón endoscópico que rompe las fibras musculares del esfínter inferior (Sanderson y cols. 1970, Levine y cols. 1991) aunque la mitad de ellos requiere una segunda dilatación en los siguientes 5 años (Gadric y cols. 1999) pero las sucesivas dilataciones tienen menos efecto (Csendes y cols. 1989, Hashimoto y cols. 2000) y causan la perforación del esófago en el 1,4% al 10% (Scott y cols. 1985, Wong y cols. 1995, Reynolds y col. 1989). La cirugía haciendo esofagomiotomía submucosa de Heller, anterior sola o asociada a la posterior (Spence y col. 1989, Yong-xian 1983, Hirashima y cols. 1978) con acceso laparoscópico o toracoscópico (Hunter y cols. 1997, Holzman y cols. 1997, Ancona y cols. 1995, Zanimotto y cols. 2000, Vogt y cols. 1997, Bowey y col. 2000, Nguyen y cols. 2000). La farmacología mediante la administración de nitritos, de antagonistas del calcio (Swamy, 1977). La isosorbide y la nifedipina alivian la sintomatología (Gelfond y cols. 1982) pero tienen efectos adversos. Por último tenemos la inyección de 80 U. de toxina botulínica por endoscopia, en el esfínter esofágico inferior, al suprimir el espasmo, es un tratamiento seguro, efectivo y simple de la acalasia, ya que sus efectos persisten bastantes meses (Pasricha y cols. 1993, 1996). Se ha visto que al igual que las dilataciones neumáticas, hay que repetir las aplicaciones, teniendo en cuenta que conforme aumentan éstas se reduce la respuesta. Su mayor indicación es en pacientes mayores con síntomas leves que no son candidatos para cirugía ni dilataciones (Amnese y cols. 1998, Vaezi y cols. 1999, Gordon, 1997).

Se investiga su empleo en la obesidad mórbida, en el parkinson, en el bruxismo, los tics faciales, el síndrome de Persona Rígida, el tartamudeo, en el dolor lumbar, en el síndrome de túnel carpiano, en la prevención de úlceras y en los espasmos de los músculos vaginales y en otras muchas enfermedades.

En el futuro podrá utilizarse la toxina y aún mejor su cadena H como una palanca para introducir en las neuronas otras sustancias como fracciones de otras toxinas o inmunoglobulinas activas contra una diana terapéutica concreta para tratar enfermedades neurológicas y mentales, para evitar la formación de placas de glutamato en la esquizofrenia o las placas amiloides en la encefalopatía espongi-forme, etc. Ya se dispone de un preparado de inmunotoxina-ricina mAb 35, compuesta por ricina conjugada a un anticuerpo monoclonal contra el receptor nicotínico de la acetilcolina del músculo estriado, para tratar distonías focales, probada por Christiansen y cols. (2002), inyectando en un recto superior del conejo 0,2 microg/kg de ricina mAb 35 sin que disminuyera el número de fibras. Las áreas del corte transversal son muy heterogéneas a los 56 días anomalías que al año habían desaparecido aunque continuaba la heterogenidad del grosor de las microfibrillas. Los cambios más significativos en la cadena pesada de la miosina (MHC) se dio en la capa orbital en la que a los 56 y 105 días había aumentado del número de miofibras rápidas y neonatales con disminución de las lentas. En la capa global al cabo de 105 días y de un año, estaban disminuidas siendo positivas la expresión de la MHC en las fibras lentas, neonatales y en las desarrolladas.

ARRUGAS

Son pliegues producidos en la piel como consecuencia de la contracción de pequeñas fibras musculares. Los pliegues pueden ser permanentes causados por el envejecimiento, y especialmente por la irradiación solar, es decir, por el fotoenvejecimiento o dermatoheliosis. Histológicamente es una inflamación crónica, caracterizada por elastosis, es decir, por el aumento de fibras elásticas que están degeneradas hasta convertirse en masas amorfas, por aumento de los glucosaminglicanos, hiperplasia e hipertrofia de los fibroblastos, presencia de abundantes mastocitos despigmentados, aumento de mononucleares y de histiocitos, con disminución y hasta desaparición de la colágena mientras que la epidermis está engrosada y con atipias. Sobre las arrugas permanentes, no mejorables por la toxina, hay otras dinámicas, causadas por el fruncimiento de los ojos, de la boca al reír, etc., causadas por la contracción de pequeñas fibras

musculares en la dermis facial. La repetición estereotipada de esos gestos aumentan y consolidan las arrugas. Las arrugas más importantes y frecuentes son las periorculares y las periorales.

La toxina botulínica es más eficaz para eliminar las arrugas dinámicas que aparecen alrededor de los ojos, a los lados de la boca, en la frente, en las bandas musculares del cuello y en la papada. La toxina inyectada en el frontal elimina las arrugas de la frente pero la frente cae sobre los ojos. La toxina se aplica por medio de cremas o de microinyecciones, efectuadas por un especialista, por medio de una aguja finísima en una sola sesión en las zonas elegidas con o sin anestesia tópica; las zonas tratadas suelen ser la interciliar, a 1 cm por encima de las cejas, en éstas, en las patas de gallo y en los músculos periorbitales, pero no en los labios porque puede causar dificultades al hablar y comer. La toxina paraliza los músculos faciales, desde las placas motoras, evitando su contracción manteniendo la expresión facial, ya que queda indemne la musculatura no tratada. También parece útil para eliminar las arrugas del cuello relacionadas con el envejecimiento. La sesión dura unos cuantos minutos, después de los cuales se puede hacer vida normal, incluso gesticular y mover los músculos inyectados, pero al menos durante cuatro horas el paciente no se debe acostar ni inclinar la cabeza para evitar el desplazamiento de la toxina; por esa razón no se deben dar masajes en la zona hasta pasadas 24 horas.

Es un tratamiento muy eficaz para eliminar el ceño fruncido, alisar la frente, mejorar patas de gallo que son arrugas dinámicas, para elevar la cola de las cejas y para elevar los párpados caídos. No se debe aplicar a personas con inestabilidad psicológica, pues quedan defraudadas sus expectativas sobre los resultados.

Los resultados se pueden apreciar a las 24-72 horas, siendo evidentes entre cuatro a ocho días, persistiendo 3 a 8 meses (media de cinco), siendo mayor en los jóvenes. Se puede repetir el tratamiento cuantas veces lo desee el paciente, aunque se debe alargar los intervalos, ya que las repeticiones pueden causar atrofas musculares. Como reacción adversa específica se puede producir debilidad en el punto de inyección y si se difunde a las placas motoras puede aparecer ptosis palpebral durante 2 a 4 semanas y pérdida de expresión de la frente.

La FDA denunció este uso de la toxina porque es un «flagrante ejemplo de promoción de una sustancia potencialmente tóxica para propósitos cosméticos». La Agencia Española del Medicamento y en consecuencia el Ministerio de Sanidad han aceptado el 18 de febrero de 2004 esta indicación.

PROCESOS ANALES

Hay una serie de procesos orgánicos como la fisura anal y otros como el absceso interesfinteriano, las complicaciones hemorroidales, los pólipos anales y los trastornos neurológicos secundarios a lesiones espinales y las afecciones pélvicas, la endometriosis, la prostatitis crónica y de otro lado patologías que no son orgánicas que producen dolor anal y alteraciones de la defecación que pueden ser tratados con la toxina botulínica. En la fisura del ano, la toxina botulínica hace desaparecer el dolor y acelera la cicatrización. La proctalgia fugax es un síndrome relacionado con el síndrome del intestino irritable más frecuente en hombres hacia la cuarentena, fue descrito en 1935 por Thaysen. Se caracteriza por dolor súbito, a menudo nocturno de tipo cólico, muy intenso, que dura menos de 20 minutos a nivel del esfínter anal externo. A veces se atenúa al doblar las rodillas sobre el abdomen o sentándose en el suelo en cuclillas. No se acompaña de alteraciones anorrectales. El proceso desaparece al cabo de unos años. La coccigodinia o síndrome del elevador, fue descrita en 1859 por Simpson como un dolor vago, continuo que se irradia hacia atrás y a los glúteos, “discomfort de estar sentado sobre una pelota” con exacerbaciones, que empeora con la sedestación y se alivia con la bipedestación, sin horario típico, siendo la palpación del coxis dolorosa. La prevalencia es mayor en mujeres de 50 a 70 años. El síndrome de periné descendente (SPD), o neuralgia pudenda. El DACI presenta dolor anal, perianal y perineal continuo, sensación de cuerpo extraño o de tenesmo, de predominio vespertino y a la palpación que se alivia con el decúbito y se exagera con la sedestación. La miopatía hipertrófica del esfínter interno es un proceso raro, descrito en 1991 como una proctalgia fugax y estreñimiento, hereditaria (Celik y cols. 1995).

Aparte de los analgésicos y de los antidepresivos, se han usado la esfínterotomía interna o la dilatación anal, por pensarse relaciona-

dos con hipertonia del esfínter anal o a complicaciones trombóticas recurrentes de hemorroides externas evanescentes, consiguiendo así, por lo general, poco alivio de los síntomas. Esto puede llevar a la estigmatización de los pacientes como portadores de lesiones recurrentes o de complicaciones post-quirúrgicas. El calor local, seco o húmedo, disminuye la presión anal basal, aunque este efecto es mayor entre los pacientes con lesiones o heridas anales que en los controles (Dodi y cols. 1986). La aplicación tópica de nitroglicerina tópica, que puede causar cefalea y es taquifiláctica, o de diltiazem tópico, mejor tolerado o 20 mg de nifedipino oral cada 12 h que reducen la presión anal en reposo en un 20% a 30%. El biofeedback se basa en que a cada contracción del esfínter externo le sigue una relajación refleja de ambos esfínteres, disminuyendo la presión basal junto con sesiones de reeducación trimestrales. Otra técnica es la electromodulación de las raíces sacras. Una alternativa puede ser la inyección de toxina botulínica en la masa del puborrectal (Hallan y cols. 1998) que reduce la presión anal basal y la de esfuerzo.

HIPERHIDROSIS

La producción de calor por el organismo es un proceso necesario para mantener la temperatura interna pero su exceso produce el temible golpe de calor; para evitarlo el organismo dispersa calórico por conducción, por convección y por la transpiratio insensibilis de unos 100 ml diarios de vapor de agua. Cuando se han superado esos mecanismos aún disponemos de la producción de sudor, que puede llegar a 50 ml por minuto durante un corto tiempo y hasta 12 litros al día. El sudor que se evapora arrastra calor de nuestra superficie. El sudor es producido por las glándulas sudoríparas controladas por el sistema nervioso simpático, de tipo colinérgico, controlado por centros hipotalámicos sobre los que actúan la temperatura ambiental, las emociones, especialmente por el miedo (la sudoración emocional, no se presenta durante el sueño), las situaciones estresantes y algunos alimentos. Una respuesta excesiva a estos estímulos aumenta el sudor especialmente en axilas, manos y pies ricas en glándulas. La hiperhidrosis no debida a la necesidad de eliminar calor puede ocasionar importantes trastornos psicológicos, perturbando la calidad de vida. La hiperhidrosis se trata con antiperspirantes tópicos como el

cloruro aluminico o aldehídos, con psicoterapia y con iontoforesis con agua del grifo, que son poco eficaces, y con anticolinérgicos que pueden ser tóxicos. La resección de la piel axilar y la simpatectomía torácica implican riesgos quirúrgicos. La toxina reduce la hipersecreción de sudor por las glándulas inervadas por el sistema parasimpático, por lo que constituye un método eficaz para la hiperhidrosis de axilas y palmas, al denervar funcionalmente a las glándulas sudoríparas, inyectando subcutáneamente 20 U. en cada uno de seis pinchazos, en cada palma y de 20 en cada axila, después de aplicar una crema anestésica. A los 3 a 7 días se reduce la cuarta parte de la sudoración que persiste 8 a 12 meses, sin que se produzca hiperhidrosis compensatoria en otras zonas. Dosis mayores difunden desde el pinchazo y pueden causar durante unos días, dificultades para deglutir y hasta para respirar y durante dos semanas debilidad de los músculos de la zona.

JAQUECA

Existe una teoría que atribuye a la contracción de los músculos de la frente la presentación de algunos casos de jaqueca, es decir, que sería una distonía para la cual Silberstein y cols. (2000) recomendaron hacer infiltraciones de 25 ó 75 U de toxina botulínica en la musculatura perifrontal para prevenir los accesos, pero aunque reduce la frecuencia y la intensidad de la cefalea, lo hace moderadamente y se presentan efectos secundarios mayores con 75 U. También se ha empleado en otras cefaleas esencialmente en la causada por la tensión de los músculos pericraneales.

TICS

Una frecuente distonía que afecta a personas de toda edad pero sobre todo a niños y jóvenes son los tics.

Los tics son movimientos involuntarios intermitentes de intensidad constante o fluctuante, que representan una prolongación de algunos movimientos rítmicos repetitivos, la mayoría complejos como guiñar un ojo, levantar un hombro, sacudir la cabeza, distor-

siones faciales, saltos o gestos obscenos (copropraxia) que pueden acompañarse de la expresión de obscenidades (coprolalia) o de repeticiones de palabras (ecolalia). En la mayoría de los casos duran unas pocas semanas desapareciendo espontáneamente. Un esfuerzo de la voluntad puede suprimir los espasmos, pero vuelven con mayor intensidad al relajarse la voluntad; los tics desaparecen con el sueño, sedantes, tranquilizantes o psicoterapia. Algunos tics son hereditarios, como la distonía paroxística, la coreoatetosis paroxística y la enfermedad de Lesch-Nyhan.

Los tics son más frecuentes en los enfermos mentales no debidos a lesiones de los ganglios basales ni de otras partes del cerebro. Pueden ser un efecto adverso de los fármacos antipsicóticos, fenotiacinas o butirofenonas. De las hidantoínas y algunos estimulantes, traumatismos, intoxicación por monóxido de carbono, encefalitis, epilepsia y corea. Aunque se ha sugerido la toxina como tratamiento de los "tics", no creemos que pueda ser eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABBASOGLU, O. E.; SENER, E. C.; SANAC, A. S. (1996): Factors influencing success and dose-effect relation of botulinum A treatment. *Eye* 10: 385-391.
- (2) ADHAMI, T.; SHAY, S. S. (2001): Esophageal motility in fue assessment of esophageal function. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 13 (3): 234-240.
- (3) AGUILAR, L. A.; VALDOVINOS, M. A.; FLORES, C.; CARMONA, R.; VARGAS, F.; HERNÁNDEZ, M. F.; GARZA, L.; (1999): Evaluación prospectiva de reflujo gastroesofagico en pacientes con Acalasia tratados con dilatación neumática, miotomía torácica o abdominal. *Rev Invest Clin* 51: 345-350.
- (4) ALISON, K.; RICHARDSON, P. T.; ALLAWAY, D.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, T. A.; THOMPSON, D. E. (1992): Sequence of the gene encoding type F neurotoxin of Clostridium botulinum. *FEMS Microbiol Lett.* 96: 225-230.
- (5) AMNESE, V.; D'ONOFRIO, V.; ANDRIULLI, A. (1998): Botulinum toxin in long-term therapy for Acalasia. *Ann Intern Med*, 128: 696.
- (6) ANCONA, E.; ANSELMINO, M.; ZANIMOTTO, G. Y COLS. (1995): Esophageal achalasia: La-paroscopic versus conventional open Heller-Dor operation. *Am J Surg* 170: 265-270.
- (7) ANDERIZ, B.; CARDONA, L. (1999): Tratamiento de la esotropía congénita con toxina botulínica. *Archivos de la Soc Esp de Oftal N.º 11.*
- (8) ARCIDIACO, M.; PERRICELLI, D.; RUMI, A.; TESTONE, G.; POGGI, L. (1989): Esophageal achalasia. Diagnostic and therapeutic implications. *Ital J Surg Sci* 19: 331-336.

- (9) BIGLAN, A. W.; BURNSTINE, R. A.; ROGERS, G. L.; SAUNDERS, R. A. (1989): Management of strabismus with botulinum toxin. *Ophthalmology* 96: 935-943.
- (10) BINZ, T.; KURAZONO, H.; POPOFF, M. R. Y COLS. (1990): Nucleotide sequence of the gene encoding Clostridium botulinum neurotoxin type D. *Nucleic Acids Res.* 18: 5556-5557.
- (11) BINZ, T.; KURAZONO, H.; WILLE, M.; FREVERT, J.; WERNARS, K. NIEMAN, H. (1990): The complete sequence of botulinum neurotoxin type A Y comparison with otros clostridial neurotoxins. *J Biol Chem.* 265: 9153-9158.
- (12) BIRGISSON, S.; GALINSKI, M.; GOLDBLUM, J. Y COL. (1997): Achalasia is not associated with measles or known herpes and human papiloma viruses. *Dig Dis Sci* 42: 300-306.
- (13) BJORCK, S.; DEMEVIK, L.; GATZINSKY, P., SANDBERG, N. (1982): Oesophagocardiomyotomy and antireflux procedures. *Acta Chir Scand* 148: 525-529.
- (14) BOISSON, J.; DEBBASCH, L.; BENSAUDE, A. (1966): Les algies anorectales essentielles. *Arch Fr Mal Appar Dig* 55: 3-24.
- (15) BOWEY, D.; PETERS, J. (2000): Laparoscopic esophageal surgery. *Surg Clin North Am* 80: 1213-1242.
- (16) BURKE, C. A.; ACHCAR, E.; FALK, G. W. (1997): Effect of pneumatic dilatation on gastroesophageal reflux in achalasia. *Dig Dis Sci* 42: 998-1002; 1997.
- (17) BURNS, C. L.; GAMMON, J. A.; GEMMILL, M. C. (1986): Ptosis associated with botulinum toxin treatment of strabismus and blepharospasm. *Ophthalmology* 93: 1.621-1.627.
- (18) CAMPBELL, K. D.; COLLINS, M. D.; EAST, A. K. (1993): Nucleotide sequence of the gene coding for Clostridium botulinum (Clostridium argentinense): type G neurotoxin: Genealogical comparison with otros clostridial neurotoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1216: 487-491.
- (19) CAMPOS, A. (1990): Acalasia. *Acta Medica Costarricense* 33: 118-121.
- (20) Colegio de Médicos y Cirujanos de Costa Rica (2003): Estudio de 27 casos de acalasia en el Hospital "Calderón Guardia". *Acta Médica Costarricense.*
- (21) CHAN, J.; BRIN, M. F.; FAHN, S. (1991): Idiopathic cervical dystonia-clinical characteristics. *Mov Disord* 6: 119-126.
- (22) CHRISTIANSEN, J. (1998): Chronic idiopathic anal pain. *Eur J Surg.* 164: 83-88.
- (23) CHRISTIANSEN, J.; BRUUN, E.; SKJOLDBYE, B. (2001): Chronic idiopathic anal pain: Analysis of ultrasonography, pathology and treatment. *Dis Colon Rectum* 44: 661-665.
- (24) CHRISTIANSEN, S. P.; PETERSON, D.; TO, T.; YOULE, R.; McLOON, L. (2002): Long term effects of ricina mAb 35 on extraocular muscles of rabbits: potential treatment for strabismus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 679 85.
- (25) CSENDES, A.; BRAGHETTO L.; HENRIQUEZ, A.; CORTES, C. (1989): Late results of a prospective randomised study comparing forceful dilatation and oesophagomyotomy in patients with Acalasia. *Gut* 30: 299-304.
- (26) CUEVAS, C.; MADRAZO, I.; MAGALLON, E.; ZAMORANO, C. Y COL. (1995): Botulinum Toxin-A for the treatment of Hemifacial Spasm. *Arch Med Res* 26: 405-408.

- (27) DEMEESTER, T. R. (1982): Surgery for esophageal motor disorders. *Ano Thorac Surg* 34: 225-229.
- (28) DE OLIVEIRA, R.; REZENDE, F.; DANTAS, R.; LAZIGI, N. (1990): The spectrum of esophageal motor disorders in Chagas disease. *Am J Gastroenterol* 90: 1119-1124.
- (29) DESA, L. A.; SPENCER, J.; MCPHERSON, S. (1990): Surgery for achalasia cardia: the Dor operation. *Ann Royal College of Surgeons of England* 72: 128-131.
- (30) DOR, J.; HUMBERT, P.; PAOLI, J. M.; NOIRCLERC, M.; AUBERT, J. (1967): Traitement du reflux par la technique dite de Heller- Nissen modifiée. *Presse Med* 50: 2563-2565.
- (31) ECKARDT, V. F.; KOHNE, U.; JUNGINGER, T.; WESTERMEIER, T. (1997): Risk factors for diagnostic delay in achalasia. *Dig Dis Sci* 42: 580-585.
- (32) ECKARDT, V. F.; DODT, O.; KANZLER, G. Y COLS. (1996): Anorectal function and morphology in patients with sporadic proctalgia fugax. *Dis Colon Rectum* 39: 755-762.
- (33) Editorial (1990): American Academy of Neurology: Assessment: the clinical usefulness of botulinum toxin A in treating neurological disorders. Report of the Therapeutics and Technology sub-committee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 40: 1332-1336.
- (34) Editorial (1994): American Academy of Neurology. Assessment Subcommittee: Training guidelines for the use of botulinum toxin for the treatment of neurological disorders. *Neurology* 44: 2401-2403.
- (35) EISEL, U.; JARAUSCH, W.; GORETZKI, K. Y COL. (1986): Tetanus toxin: Primary structure, expression in E coli, and homology with botulinum toxins. *Embo J.* 10: 2495-2502.
- (36) ELLIS, F. H.; CROZIER, R. E.; GIBB, S. P. (1986): Reoperative achalasia Surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 859-65.
- (37) ELLIS, F. H.; CROZIER, R. E.; WATKINS, E. (1984): Operation for esophageal achalasia. Results of esophagomyotomy without an antireflux operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 88: 344-351.
- (38) FAHN, S. (1986): Generalized dystonia: concept and treatment. *Clin Neuropharmacol* 9: S37-S48.
- (39) FAHN, S. (1988): Concept and classification of dystonia. *Adv Neurol* 50: 1-8.
- (40) FAHN, S. (1990): Recent concepts in the diagnosis and treatment of dystonias. In Chokroverty S, ed: *Movement Disorders*. Costa Mesa, CA; PMA Publishing Corp. 237-258.
- (41) FERGUSON, M. K. (1991): Achalasia: current evaluation and therapy. *Ano Thorac Surg* 52: 336-342.
- (42) FOSTER, L. Y COLS. (2001): Botulinum toxin A and chronic low back pain: A randomised, double blind study. *Neurology* 56, 1290-1293.
- (43) GADRIC, M.; SABATE, J. M.; ARTRU, P.; CHAUSSADE, S.; COUTURIER, D. (1999): Results of pneumatic dilatation in patients with dysphagia after antireflux surgery. *Br J Surg* 86(8): 1088-1091.
- (44) GAUTHIER, S. (1986): Idiopathic spasmodic torticollis. Pathophysiology and treatment. *Can J Neurol Sci* 1986; 13: 88-90.

- (45) GELFOND, M.; ROZEN, P.; GILAT, T. (1982): Isosorbide dinitrate and nifedipine treatment of achalasi: a clinical, manometric and radionuclide evaluation. *Gastroenterology* 83: 963-969.
- (46) GOLDBLUM, J. R.; WHYTE, R. I.; ORRINGER, M. B.; APPELMAN, I. D. (1994): Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens. *Am J Surg Pathol* 18: 327-337.
- (47) GOLDBLUM, J. R.; RICE, T. W.; RICHTER, J. E. (1996): Histopathologic features in esop-hagomyotomy specimens from patients with achalasia. *Gastroenterology* 111: 648-654.
- (48) GOLDSTEIN, J. L.; YERSON, R. G.W.; BROWN, M. S. (1979): Coated pits, coated vesicles Y receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 279: 679-689.
- (49) GÓMEZ DE LIAÑO SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, J. M.; DE ANDRÉS, M. L. Y COL. (1996): Tratamiento del estrabismo convergente con cirugía o con toxina botulínica. *Acta Estrabológica* 1996; 25: 147-153.
- (50) GÓMEZ VILLAESCUSA, F.; GARCÍA GARCÍA, N.; ARIAS LÓPEZ, M. C. (1996): Estudio de pacientes inicialmente tratados con toxina botulínica y que han precisado cirugía convencional. *Acta Estrabológica* 25: 107-153.
- (51) GORDON, M.; EAKER, E. Y. (1997): Prospective study of esophageal botulinum toxin injection in high risk. *Dig Dis Sci*. 42: 724-7.
- (52) GRIMAUD, J. C.; BOUVIER, M.; NAUDY, B. Y COLS. (1991): Manometric and radiologic investigations and biofeed-back treatment of chronic idiopathic anal pain. *Dis Colon Rectum*; 34: 690-695.
- (53) HABERMANN, E. (1974): ¹²⁵I labeled neurotoxin from Clostridium botulinu A. *Arch Pharmakol*. 281: 47.
- (54) HABERMANN, E. (1989): Clostridial neurotoxins and the central nervous system: Funcional studies on isolated preparations. En: Simpson LL, ed. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. New York, NY: *Academic Press, Inc.* 53-67.
- (55) HARVEY, S. M.; STURGEON, J.; DASSEY, D. E. (2002): Botulism due to Clostridium baratii type F toxin. *J Clin Microbiol*. 40: 2260-2.
- (56) HASHIMOTO, T.; UCHIDA, Y.; NOGUCHI, T.; TAHARA, K. (2000): Clinical management of esophageal achalasia. *Nippon Geka Gakkai Zashi* 101: 342-344.
- (57) HAUSOR, D.; POPOFF, M. R.; KURAZONO, H. Y COL. (1990): Complete sequence of botulinal C1 neurotoxin. *Nucleic Acids Res*. 18: 4924-4928.
- (58) HENDERSON, R. D.; RYDER, D. E. (1982): Reflux Control Following myotomy in diffuse Esophageal Spasm. *Ano Thorac Surg* 34 (3): 230-236.
- (59) HIRASHIMA, T.; SATO, H.; RARA, T.; NAKAMURA, H.; KAWAMURA, L.; TAKEUCHI, H.; MUTO, M.; OHKAWA, H. (1978): Results of Esophagocardioplasty with Gastric Pouch in the Treatment of Esophageal Achalasia. *Ann Surg* 188: 38-42.
- (60) HOLZMAN, M. D.; SHARP, K. W.; ELLER, R. F. (1997): Laparoscopic surgical treatment of achalasia. *Am J Surg* 173: 308-311.
- (61) HOOGERWERF, W. A. PASRICHA, P. J. (2000): Achalasia: treatment options revisited. *Can J Gastroenterology* 14: 406-409.

- (62) HOWARD, P. J.; MAHER, L.; PRYDE, A. Y COLS. (1992): Five year prospective study of in-cidence, clinical features and diagnosis of achalasia in Edinburg. *Gut* 33: 1011-1015.
- (63) HUNTER, J. G.; TRUS, T. L.; BRANUM, G. D.; WARING, J. P. (1997): Laparoscopic Heller myotomy and funduplication for achalasia. *Ann Surg* 225: 655-664.
- (64) IHARA, H.; KOHDA, T.; MORIMOTO, F.; TSUKAMOTO, K.; KARASAWA, T.; NAKAMURA, S.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S. (2003): Sequence of the gene for Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C terminal half of heavy chain and its binding activity. *Biochim Biophys Acta*. 1625: 19-26.
- (65) JANKOVIC, J.; ORMAN, J. (1987): Botulinum A Toxin for cranial - cervical dystonia: a double-blind, placebo - controlled study. *Neurology* 37: 616-623.
- (66) JARA, F. M.; TOLEDO-PEREIRA, L. H.; MAGILLIGAN, D. J. (1979): Long-term results of esophagomyotomy for Achalasia of esophagus. *Arch Surg* 114: 935-936.
- (67) JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A. (2001): A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett*. 242: 211-214.
- (68) JORDAN, P. H. (2001): Long-term results of esophageal myotomy for achalasia. *J Am Coll Surg* 193: 137-145.
- (69) JUST, I.; HOFMANN, F.; GENTH, H.; GERHARD, R. (2001): Bacterial protein toxins inhibiting low molecular mass GTP binding proteins. *Int J Med Microbiol*. 291: 243-50.
- (70) KAMM, M. A.; HOYLE, C. H. V.; BURLEIGH, D. E. (1991): Hereditary internal anal sphincter myopathy causing proctalga fugax and constipation. *Gastroenterology* 100: 805-810.
- (71) KJELLIN, A. P.; GRANQVIST, S.; RAMEL, S.; THOR, K. B. (1999): Laparoscopic myotomy without funduplication in patients with achalasia. *Eur J Surg* 165: 1162-1166.
- (72) LEVINE, M. L.; MOSKOWITZ, G. W.; DORF, D. S.; BANK, S. (1991): Pneumatic dilatation in patients with achalasia with modified Gruntzig dilator (Levine): under direct endoscopic control. Results after 5 years. *Am J Gastroenterology* 86: 1581.
- (73) LIMMROTH, V.; MICHEL, M. C. (2000): The prevention of migraine: a critical review with special emphasis on beta-adrenoceptor blockers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52: 237-243.
- (74) MAGNI, G.; BERTOLINI, C.; DODI, G. (1986): Douleur perianal chronique: Considerations psychopathologiques caracteristiques. *Psicopathologie* 19: 170-174.
- (75) Mainieri-Hidalgo, J. A.; Schmitz-Gerstlauer, I.; Mainieri-Breedy, G. (2002): *Rev Mex Neuroci* 3: 23325.
- (76) MARTÍ, M. J.; KULISEVSKY, J.; TOLOSA, E. (1987): Tratamiento del blefarospasmo distónico y el espasmo hemifacial con toxina botulinica *Med Clin (Barc)*: 89: 321-323.

- (77) MAULLON, J.; THOUMAS, D.; LEROI, A. M. Y COLS. (1999): Results of pudendal nerve neurolysis-transposition in twelve patients suffering from pudendal neuralgia. *Dis Colon Rectum* 42: 186-192.
- (78) McNEER, K. W.; SPENCER, R. F.; TUCKER, M. G. (1994): Observations on bilateral simultaneous botulinum toxin injection in infantile esotropia. *J Pediatric Ophthalmol Strabismus* 31: 214-219.
- (79) MIDDLEBROOK, J. L. (1989): Cell surface receptors for protein toxins. In: Simpson LL, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. New York, NY: *Academic Press Inc.* 95-119.
- (80) MIDDLEBROOK, J. L. (1993): Contribuciones of the U.S. Army to botulinum toxin research. En Das Gupta B, ed. *Botulinum and Tetanus Neurotoxins Y Biomedical Aspects*. New York, NY: *Plenum Press* 515-519.
- (81) MIDDLEBROOK, J. L. (1996): Franz Inv y C Marzo.
- (82) MONNI, S.; RODDI, R.; BROCCARDO, M.; TURCI, R.; SAMPIETRO, L.; VILLA, E. M. (1984): Prevention of gastroesophageal reflux. Validity of hemifunduplica-tion according to Cor-Casolo *Chir Ital* 36: 151-178.
- (83) MORENO, E.; GARCÍA, A.; GARCÍA, L.; GÓMEZ, M.; RICO, P.; JOVER, J. M.; ARIAS, J. (1988): Results of Surgical Treatment of Esophageal Achalasia. Multicen-tric Retrospective Study of 1.856 Cases. *Int Surg* 73: 69-77.
- (84) MOSCA, F.; CONSOLI, A.; LATTERI, S. (1992): Esophageal achalasia: cardiomyo-tomy or pneumatic dilation? *Minerva Chir* 47: 1421-1428.
- (85) NEILL, M. E.; SWASH, M. (1982): Chronic perianal pain: An unsolved pro-blem. *J R Soc Med* 75: 96-101.
- (86) NGUYEN, N. T.; WANG, P.; FOLLETT, D. (2000): Laparoscopy or thoracoscopy for achalasia. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 12 (3): 201-5.
- (87) NICOSIA, J. F.; ABCARIAN, H. (1985): Levator syndrome. A treatment that wor-ks. *Dis Colon Rectum* 28: 406-408.
- (88) NIWAMOTO, H.; OKAMOTO, E.; FUJIMOTO, J. (1995): Are human herpes virus or meas-les associated with esophageal achalasia? *Dig Dis Sci* 40: 859-863.
- (89) ORRINGER, M. B.; ORRINGER, J. S. (1982): Esophagectomy: Definitive Treat-ment for Esophageal Neuromotor Dysfunction. *Ann Thorac Surg* 34: 237-248.
- (90) OTT, D. J.; RICHTER, J. E.; CHEN, Y. M. Y COL. (1987): Esophageal radiography and mano-metry: Correlation 172 patients with dysphagia. *AJR* 149: 307-311.
- (91) PAIG, G. P.; ELLISON, R. G.; RUBIN, J. W.; MOORE, H. V. (1984): Two decades of experience with modified Heller's myotomy for achalasia. *Ann Thorac Surg* 38: 201-206.
- (92) PARICHA, P. J.; RAI, R.; RAVICH, W. J. Y COL. (1996): Botulinum toxin for achalasia. Long-term outcome and predictors of response. *Gastroenterology* 110: 1410-1415.
- (93) PASRICHA, P. J.; RAVICH, W. J.; KALOO, A. N. (1993): Effects of intraesphinc-teric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gas-troenterology* 105: 1045-1049.

- (94) PATER, J. B.; LEE, J. P. (1992): The value of high quality Electromyographic monitoring for botulinum toxin therapy. *ESA*.
- (95) RICHTER, J. E. (1995): Motility disorders of the esophagus. En: Yamada T, Alpers DH, Owyang C, Powel DW, Silverstein FES. Eds. *Textbook of Gastroenterology*. Vol. 1 (2.^a ed.): Philadelphia, JB Lippencott Comp. 1174-1213.
- (96) REYNOLDS, J. C.; PARKMAN, H. P. (1989): Achalasia. *Gastroenterol Clin North Am* 18: 223-255.
- (97) RICHARDS, W. O.; CLEMENTS, R. H.; WANG, P. C.; LIND, C. D.; MERTZ, H.; LADIPO, J. K.; HOLZMAN, M. D.; SHARP, K. W. (1999): Prevalence of gastroesophageal reflux after laparoscopic Heller myotomy. *Surg Endosc* 13: 1010-1014.
- (98) RODRÍGUEZ, J. M.; GÓMEZ DE LIAÑO, P.; GÓMEZ DE LIAÑO, R. (1992): Tratamiento del estrabismo con toxina botulínica. *Acta Estrabológica* 1992; 21-27.
- (99) ROSSY, L. A.; BUCKELEW, S. P.; DORR, N. Y COLS. (1999): A meta-analysis of fibromyalgia treatment interventions. *Ann Behav Med* 21: 180-191.
- (100) SANDERSON, D. R.; ELLIS, F. H.; OLSEN, A. M. (1970): Achalasia of the esophagus: Re-sults of therapy by dilatation. 1950-1967. *Chest*. 58: 116-21.
- (101) SANDLER, R. S.; NYREN, O.; EKBOM, A. Y COL. (1996): The risk of esophageal cancer in patients with achalasia: A population-based study. *JAMA* 274: 359-362.
- (102) SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. (1992): Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in Medicine. *Microbiol Rev* 56: 80-99.
- (103) SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B. Y COL. (1992): Tetanus Y botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 359: 832-835.
- (104) SCOTT, A. B. (1980): Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatric Ophthalmol Strabismus* 17: 21-25.
- (105) SCOTT, A. B. (1989): Botulinum toxin treatment of strabismus. Focal points. *Clinical Modules for Ophthalmologists*. San Francisco, American Academy of Ophthalmology. 7: 1-11.
- (106) SCOTT, A. B.; MAGOON, E. H.; MCNEER, K. W. Y COL. (1997): Botulinum toxin of childhood strabismus. *Ophthalmology* 1990; 97: 1435-1438; SHOENUT, F.; DUERKSEN, D., YAFFE, C. S. (1990): A prospective assesement of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 92: 1109-1112.
- (107) SHIINO, Y.; FILIPI, C. J.; AWARD, Z. T.; TOMONAGA, T.; MARSH, R. E. (1999): Surgery for achalasia. *J GastroIntest Surg* 3: 447-455.
- (108) SHIMA, F.; FUKUI, M.; KITAMURA, K.; KUROMATSU, C.; OKAMURA, T. (1988): Diagnosis and surgical treatment of spasmodic torticollis of the nerve origin. *Neurosurgery* 22: 358-363.
- (109) SILBERSTEIN, S. Y COLS. (2000): Botulinum toxin type as a migraine preventive treatment 40: 445-450.
- (110) SIMPSON, L. L. (1989): Peripheral accions of the botulinum toxins. En Simpson LL, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. New York, NY: Academic Press Inc 153-178.

- (111) SPENCE, P. (1989): Heller's Contribution to the surgical treatment of achalasia of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 48: 876-881.
- (112) STEIN, H. J.; KORN, O.; LIEBERMANN-MEFFERT, D. (1995): Manometric vector volume analysis to assess lower esophageal sphincter function. *Ann Chir Gynaecol* 84 (2): 151-8.
- (113) STREITZ, M.; EILIS, F. H.; GIPP, S. P.; HEATLEY, G. M. (1995): Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients. *Ann Thorac Surg* 59: 1604-1609.
- (114) SWAMY, N. (1977): Esophageal spasm: clinical and manometric response to nitroglycerine and long acting nitrites. *Gastroenterology* 72 (1): 23-27.
- (115) THOMPSON, D. E.; BREHM, J. K.; OULTRAM, J. D. Y COL. (1990): The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem.* 189: 73-81.
- (116) TRACEY, J. P.; TRAUBE, M. (1994): Difficulties in the diagnosis of pseudoachalasia. *Am J Gastroenterol* 89: 2014-2019.
- (117) VAEZI, M. F.; RICHTER, J. E.; WILCOX, C. M. Y COL. (1999): Botulinum toxin versus pneumatic dilation in the treatment of achalasia: A randomised trial. *Gut* 44: 231-239.
- (118) VEME, G.; SALLUSTIO, J.; BAKER, E. (1997): Anti-myenteric antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig Dis Sci* 42: 307-313.
- (119) WHELAN, S. M.; ELMORE, M. J.; BODSWORTH, N. J.; ATKINSON, T.; MINTON, N. P. (1992): The complete amino acid sequence of the Clostridium botulinum type-E neurotoxin, derived by nucleotide-sequence analysis of the encoding gene. *Eur J Biochem.* 204: 657-667.
- (120) VOGT, D.; CURET, M.; PITCHER, M. Y COL. (1997): Successful treatment of esophageal Achalasia with laparoscopic Heller myotomy and Toupet fundoplication. *Am J Surg* 174: 709-714.
- (121) WONG, R. K.; MAYDONOVITCH, C. L. (1995): Achalasia. In: The esophagus, 2d ed, Castel, Do (Ed), Little Brown, Boston.
- (122) WONG, R.; MAYDONOVITCH, C.; METZ, S.; BAKER, J. (1989): Significant DQW1 association in achalasia. *Dig Dis Sci* 34: 349-352.
- (123) YONG-XIAN, Y. (1983): Treatment of Esophageal Achalasia (Cardiospasm): with Diaphragmatic Graft: Report of 44 Patients. *Ann Thorac Surg* 35: 249-252.
- (124) ZAAIJER, J. (1923): Cardiospasm in the aged. *Ann Surg.* 77; 615.
- (125) ZANIMOTTO, G.; COSTANTINI, M.; MOLENA, D.; BUIN, F.; CARTA, A.; NICOLETTI, L.; ANCONA, E. (2000): Treatment of esophageal Achalasia with laparoscopic Heller myotomy and Dor partial anterior fundoplication: prospective evaluation of 100 consecutive patients. *J Gastrointest Surg* 4: 282-289.

————— *Artículo Original* —————

Nuevas perspectivas farmacológicas de la melatonina en el tratamiento de las patologías oculares

JESÚS PINTOR

*Profesor Titular del Dept. de Bioquímica y Biología Molecular IV
E. U. Óptica, Universidad Complutense de Madrid*

RESUMEN

La melatonina, conocida neurohormona que participa en el control de los ciclos circadianos, presenta una nueva dimensión cuando es ensayada para el tratamiento de algunas patologías oculares. En Particular, la administración de esta neurohormona permite observar una clara y prolongada disminución de la presión intraocular en los modelos animales experimentales. Este hecho es relevante por cuanto el tratamiento de la patología denominada glaucoma se lleva a cabo por medio de fármacos que reducen la presión intraocular. Otro papel relevante que lleva a cabo esta sustancia es la aceleración de la cicatrización en las heridas corneales superficiales. Aplicada en forma de colirio, la melatonina acelera la cicatrización hasta en un 165%, por lo que también podría ser empleada para facilitar la cicatrización de heridas corneales o como complemento tras las operaciones de cirugía ocular.

Palabras clave: Cicatrización corneal.—Glaucoma.—Melatonina.—Presión intraocular.

ABSTRACT

Melatonin is a neurohormone which participates in the control of circadian cycles. This substance presents a new dimension as a drug when it is assayed for the treatment of some ocular pathologies. In particular, the administration of this compound permits to observe a clear and sustained reduction in the intraocular pressure. This is relevant fact since most of the treatments of glaucoma are based on a reduction in the ocular pressure. Another role of melatonin is the acceleration

of the corneal wound healing. When topically applied, melatonin can accelerate the rate of re-epithelialisation up to 165 %, therefore this compound may be used to facilitate corneal wound healing or as a complementary drug after ocular surgery.

Key words: Corneal wound healing.—Galucoma.—Melatonin.—Intraocular pressure.

La melatonina es una neurohormona que media en los procesos de luz y oscuridad para sincronizar la fisiología celular de todos los organismos con el fotoperiodo (Bartness y Goldman, 1989). Esta sustancia es capaz de desempeñar tareas muy diversas aparte de la anteriormente citada. De hecho, se ha podido comprobar que la melatonina puede alterar los procesos de proliferación y diferenciación celular, se comporta como sustancia promotora del sueño e incluso puede funcionar como molécula protectora frente a los radicales libres (Benitez-King y col., 1990)

Las funciones que desempeña la melatonina están mediadas a través de receptores de membrana que pueden ser de 3 tipos: MT_1 , MT_2 y MT_3 (Dubocovich, 1995). Desde el punto de vista bioquímico los dos primeros se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, mientras que el MT_3 parece estar acoplado a la fosfolipasa C (Mullins y col., 1997). Los receptores MT_1 y MT_2 han sido clonados de varias especies, sin embargo, el receptor MT_3 aun no ha sido clonado y es el receptor del que se posee menos información, tanto estructural como funcional. Los intentos de clonar este receptor han sido hasta la fecha infructuosos puesto que al intentarlo se ha clonado el enzima quinona reductasa 2 (QR2) (Nosjean y col., 2000).

La melatonina y sus receptores se han encontrado en diversas estructuras oculares entre las que se puede destacar la retina, en donde puede modificar la fisiología visual (Vanecek, 1998). Un buen ejemplo de ello es comprobar como la melatonina afecta a la liberación de dopamina de las células amacrinas de la retina en el proceso de adaptación a la oscuridad (Blazynski & Dubocovich, 1991). También se sabe que regula el funcionamiento de las células ganglionares ya que se han identificado receptores en estas células.

Además de la retina, otra zona ocular relevante es la córnea, donde se han descrito receptores recientemente, sugiriendo algún

papel para esta neurohormona (Wiechman et al., 2004). También se ha visto que existen receptores para la melatonina en el cuerpo ciliar, como demuestran los trabajos presentados por el grupo de Osborne, y que han sido corroborados en el modelo *Xenopus laevis*, en donde se ha descrito la presencia de un receptor MT_2 en las células del epitelio no pigmentado (Osborne & Chidlow, 1994). La presencia de éstos receptores sugiere que la melatonina pueda participar en la formación del humor acuoso y que por consiguiente tenga un papel relevante en el control de la presión intraocular.

LA MELATONINA CONTROLA LA PRESIÓN INTRAOCULAR

La presión intraocular (PIO) es un proceso fisiológico que depende de la producción del humor acuoso en los procesos ciliares y de su drenaje por la malla trabecular. La PIO cambia a lo largo del día, siendo más elevada durante el día y menor durante la noche. Este comportamiento, que sigue un patrón circadiano, está regulado por la melatonina como así ha sido descrito en diversos modelos animales (Liu & Dacus, 1991). La presión intraocular esta gobernada por el sistema nervioso simpático y parasimpático. Se acepta como norma que el sistema nervioso simpático, a través del neurotransmisor adrenalina, regula la producción del humor acuoso en el cuerpo ciliar. Por el contrario, el sistema nervioso parasimpático controla la dinámica del humor acuoso a nivel de la malla trabecular, es decir, en uno de los principales lugares por donde drena del humor acuoso.

En la actualidad, hemos investigado cual es el papel de la melatonina en la presión intraocular en conejos albinos de Nueva Zelanda (Pintor y col., 2001). En este modelo, la aplicación tópica en forma de colirio de esta neurohormona o alguno de sus análogos, produce una disminución de la presión intraocular que es dependiente de la concentración (Pintor y col., 2001). En particular el compuesto 5-metoxycarbonilamino-N-acetilriptamina (5-MCA-NAT), presenta un efecto muy notable sobre la presión intraocular reduciéndola hasta más de un 40% (figura 1). Uno de los rasgos más sobresalientes de la acción del 5-MCA-NAT no es solo su eficacia disminuyendo la presión intraocular, sino la larga duración que se

obtiene con tan sólo una aplicación. Tanto es así que el efecto es superior a 8 horas (figura 1B). Desde el punto de vista farmacológico, el 5-MCA-NAT es un agonista del receptor de melatonina del tipo MT_3 (Dubocovich, 1995). Este compuesto presenta un efecto más sostenido que la propia melatonina, que como se puede ver en la figura 1B, presenta un comportamiento de tipo transitorio. Las características extraordinarias del 5-MCA-NAT sugieren a este com-

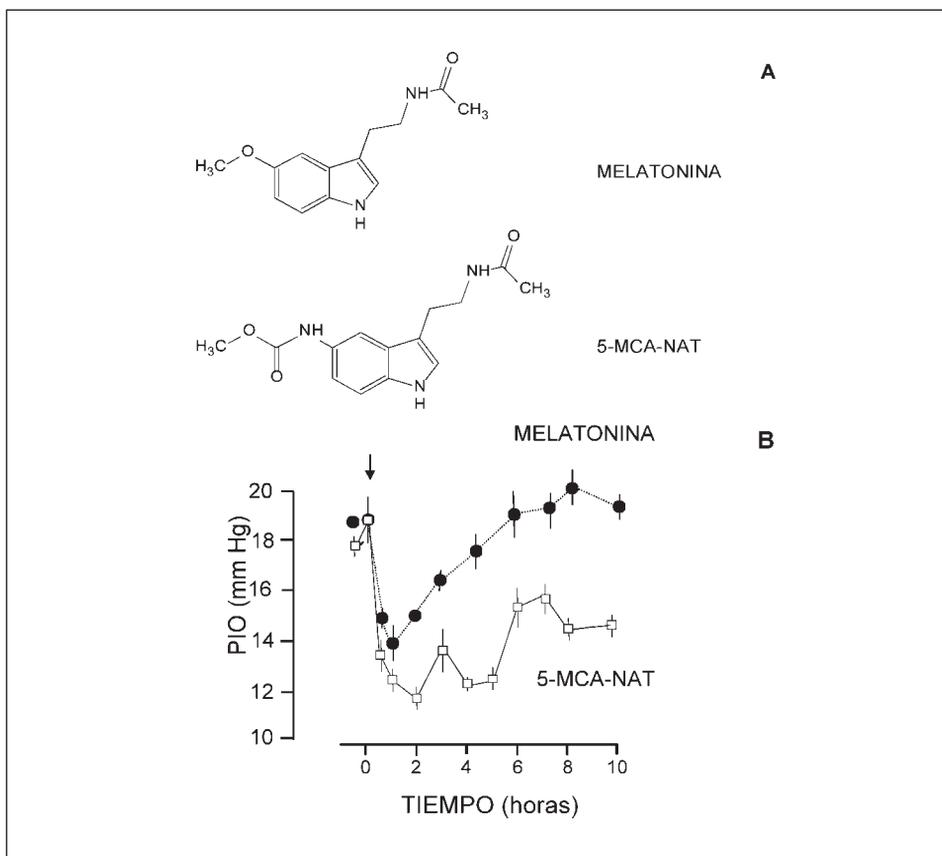


FIGURA 1. Efecto de la melatonina y el 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.

1A. Estructura de la melatonina y de su análogo el 5-MCA-NAT (5-metoxi carbonilamino N acetil triptamina).

1B. Efecto de la melatonina y el 5-MCA-NAT (100 μ M) sobre la presión intra-ocular (PIO) en conejos albinos. La flecha indica el momento en el que se aplica la correspondiente sustancia.

puesto como posible fármaco para el tratamiento de la hipertensión ocular, motivo por el cual hemos solicitado una patente nacional, otra USA y una tercera Internacional (PCT) sobre esta invención.

Durante los últimos años hemos podido estudiar no solamente el comportamiento de la melatonina y el 5-MCA-NAT sino que hemos estudiado todo el conjunto de análogos de la melatonina disponibles comercialmente (Pintor y col., 2001). Con todos estos estudios farmacológicos y con el empleo de antagonistas selectivos, ha sido posible determinar que el receptor encargado de reducir la presión intraocular es del tipo MT_3 (Pintor y col., 2003). La conclusión general de nuestros experimentos es la existencia de un receptor del tipo MT_3 que reduce la presión intraocular, sin embargo hasta la fecha se desconoce su ubicación y que proceso de la dinámica del humor acuoso controla, si bien la producción o drenaje.

Pese a desconocer en qué lugar actúa la melatonina, sí poseemos información preliminar sobre la relación entre la activación del receptor MT_3 y las terminales nerviosas colinérgicas y noradrenérgicas que controlan la dinámica del humor acuoso.

La aplicación de antagonistas nicotínicos y muscarínicos, así como de antagonistas α_2 y β_2 , producen un aumento de la presión intraocular en ausencia de melatonina o análogos. Cuando se combinan los mencionados antagonistas con los agonistas melatoninérgicos, se puede apreciar una disminución sustancial del efecto de la melatonina y del 5-MCA-NAT, que pueden oscilar entre un 12 y un 25 %. Este hecho sugiere la posible conexión entre el efecto de la melatonina y la inervación que controla la producción y/o drenaje del humor acuoso (Pintor y col., 2003).

Un punto en el cual puede estar actuando la melatonina son las terminales colinérgicas que facilitan la evacuación del humor acuoso, ya que la liberación de este neurotransmisor disminuye la presión intraocular. En este caso la melatonina facilitaría la liberación de más acetilcolina (ACh) de dichas terminales, tal y como sucede en otras áreas como en el *nucleus acumbens* donde los niveles de ACh aumentan tras la estimulación con melatonina. No obstante, no podemos olvidar que la melatonina podría actuar de manera semejante con el sistema nervioso simpático. En cualquier caso, el grado de inhibición obtenido con los antagonistas adrenérgicos y coliné-

gicos no es completo por lo que la melatonina probablemente este actuando también de manera directa sobre el mecanismo de producción o el de drenaje del humor acuoso.

Recientemente ha sido publicado un artículo en el cual se describe el efecto de la melatonina y sus análogos en un modelo más adaptado al tratamiento del glaucoma. En particular, los investigadores, trabajando con un modelo de mono glaucomatoso, demostraron que tanto la melatonina como el 5-MCA-NAT disminuían la presión intraocular en los mencionados monos. Este hecho es extraordinariamente relevante puesto que de un modo claro está poniendo de manifiesto la eficacia de estos compuestos en un modelo muy próximo al hombre (Serle y col., 2004).

LA MELATONINA ACELERA LA CICATRIZACIÓN CORNEAL

El epitelio corneal, al ser la parte más superficial del ojo, se encuentra expuesto a muchas agresiones. Algunas de ellas son fortuitas, como la entrada en el ojo de un cuerpo extraño, o la lesión que puede producir una lente de contacto en mal estado. En otros casos las operaciones de cirugía refractiva, tan de moda en la actualidad, lesionan temporalmente la córnea. Sea cual sea el origen de la lesión, la córnea debe repararse rápidamente para que el ojo no tenga riesgo de contraer infecciones y para que igualmente el individuo afectado recupere su visión.

No existe en la actualidad ningún fármaco que tenga propiedades reepitelizantes. La mayoría de los preparados actuales se encargan de prevenir las posibles infecciones de la superficie ocular, pero no aceleran la velocidad con la que se repara el epitelio corneal después de una lesión.

Nuestros estudios realizados en conejos de albinos, muestran que cuando se realiza una lesión en la superficie y se instila la melatonina, la velocidad con la que cicatriza (se reepiteliza) la superficie corneal se acelera respecto al animal sin tratar. Así por ejemplo en los animales control, una herida de 3 mm de diámetro tarda en cicatrizar 29 horas, mientras que la herida tratada con melatonina (10 nmoles), cicatriza en tan sólo 20 horas. Tal diferen-

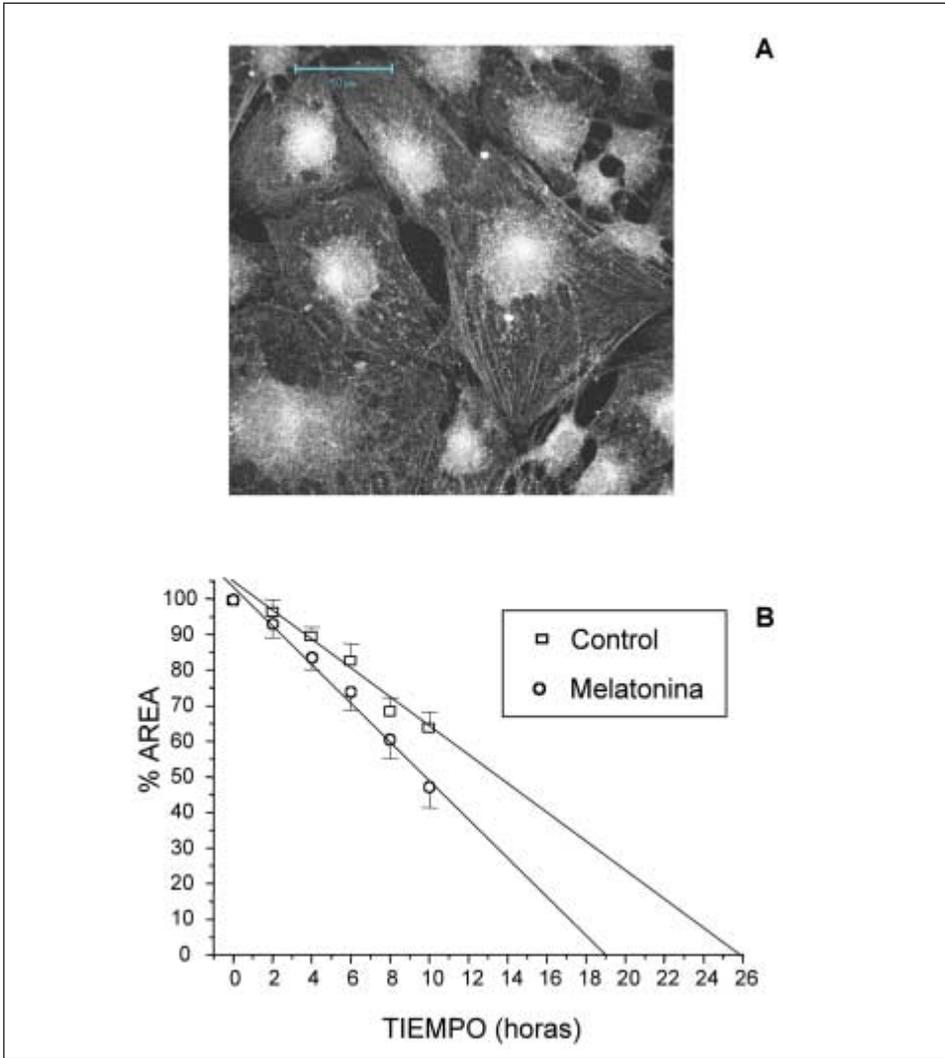


FIGURA 2. Efecto de la melatonina sobre las células del epitelio corneal.

2A. Identificación de las células del epitelio corneal en cultivo primario. El marcaje fue realizado incubando el anticuerpo frente a la citoqueratina 3, que es específico para el epitelio corneal. Esta imagen está tomada con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200, equipado con un modulo LSM Pascal y el objetivo 63x.

2B. Efecto de la melatonina sobre la velocidad de cicatrización corneal. Se puede observar como la velocidad de cicatrización en presencia de melatonina 100 μM es superior a la que se obtiene en ausencia de la sustancia (control).

cia puede deberse a la activación de receptores de melatonina cuyo efecto fisiológico sea el aumento de la velocidad de migración celular en aquellas células que se encuentran en el entorno de la lesión. Una estimación de la velocidad con la que migran las células epiteliales corneales indica que en presencia de melatonina la velocidad es de unas 110 $\mu\text{m}/\text{hora}$, mientras que en ausencia de esta sustancia (condiciones control) la velocidad de cicatrización corneal es de 75 $\mu\text{m}/\text{h}$.

Un aspecto interesante ha sido comprobar cómo el antagonista de los receptores de melatonina, luzindol, puede abolir el efecto reepitelizador de la neurohormona, reduciendo la velocidad de cicatrización a 52 $\mu\text{m}/\text{h}$. En la actualidad se ha descrito la presencia de alguno de los receptores de melatonina en el epitelio corneal. Estos estudios, que son todavía preliminares, no arrojan información sobre el papel fisiológico que podrían desempeñar los mismos sobre el funcionamiento de estas células. Tal vez la propiedad reepitelizadora de la melatonina aquí descrita sea uno de los efectos mediados por éstos receptores (Meyer y col., 2002).

Por medio de cultivos celulares primarios obtenidos a partir de córneas de conejos, hemos podido repetir estos experimentos *in vitro*. Este modelo experimental permite obtener cultivos monocapa que mantienen las principales características morfológicas de las células y que se pueden identificar como tales por medio del anticuerpo frente a la citoquetratina 3 (figura 2A). Cuando se repiten los experimentos de cicatrización en los cultivos, es posible observar un comportamiento similar al que se obtiene con el animal completo. Así, y tal y como se muestra en la figura 2B, la melatonina es capaz de acelerar la reepitelización hasta unas 7 horas cuando se compara con el control. Por consiguiente y como conclusión, podemos decir que la melatonina, tanto *in vivo* como *in vitro* es capaz de acelerar la migración celular y cicatrizar más rápidamente las lesiones corneales superficiales.

CONCLUSIONES

Pese a que la melatonina es una neurohormona bien conocida por su papel en el control y regulación de los ciclos circadianos, se abre

una nueva perspectiva para la misma fundamentada en su utilización como agente farmacológico en determinadas patologías oculares. Ya bien sea la melatonina o alguno de sus análogos sintéticos como el 5-MCA-NAT, estas moléculas parecen muy efectivas en el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma por un lado y en la cicatrización corneal por otro. Queda un camino largo hasta que logremos comprender cuáles son los mecanismos moleculares que generan los efectos aquí descritos, las estructuras oculares en las cuales se encuentran sus receptores, así como el analizar si la melatonina puede tener alguna otra aplicación como agente terapéutico ocular.

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia de referencia DGICYT SAF2004-06119-C02-01.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. (1989): Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia*; 45(10): 939-45.
- (2) BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTON-TAY, F. (1990): Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J-Pineal-Res.*; 9(3): 209-20.
- (3) BLAZYNSKI, C. AND DUBOCOVICH, M. L. (1991): Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem*; 56, 1873-1880.
- (4) DUBOCOVICH, M. L. (1995): Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends-Pharmacol-Sci.* Feb; 16(2): 50-6.
- (5) LIU, J. H.; DACUS, A. C. (1991): Aqueous humor cyclic AMP and circadian elevation of intraocular pressure in rabbits. *Curr-Eye-Res.*; 10(12): 1175-1177.
- (6) MULLINS, U. L.; FERNANDES, P. B. & EISON, A. S. (1997): Melatonin agonist induce phosphoinositide hydrolysis in *Xenopus laevis* melanophores. *Cell Signal.*; 9, 169-173.
- (7) NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGE, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J. M.; LEFOULON, F.; FAUCHERE, J. L.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. (2000): Identification of the melatonin-binding site MT₃ as the quinone reductase 2. *J-Biol-Chem.* 6; 275(40): 31311-31317.
- (8) OSBORNE, N. N. AND CHIDLOW, G. (1994): The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp.Eye.Res.* 59 (1), 3-9.
- (9) PINTOR, J.; MARTÍN, L.; PELÁEZ, T.; HOYLE, C. H. V. & PERAL, A. (2001): Involvement of melatonin MT₃ receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.*; 416, 251-254.
- (10) PINTOR, J.; PELÁEZ, T.; HOYLE, C. H. V. AND PERAL, A. (2003): Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT₃ receptor. *Brit. J. Pharmacol.*, 138, 831-836.

————— *Artículo Original* —————

Activación de la calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, por el uridin nucleósido difosfato, UDP, en neuronas granulares de cerebelo

CRISTINA HERVÁS, DAVID LEÓN, RAQUEL P. SEN
Y M.^a TERESA MIRAS-PORTUGAL

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. UCM

RESUMEN

Las neuronas granulares de cerebelo en cultivo presentan receptores metabotrópicos de nucleótidos de tipo P2Y₆, cuyo agonista fisiológico específico es el nucleótido, uridina difosfato, UDP. Estudios de PCR muestran la presencia de este receptor y el incremento de la expresión con el tiempo. Los estudios de respuesta en célula individual mediante microfluorimetría muestran un incremento del calcio citosólico al estimular con UDP, siendo los incrementos mas significativos en el soma. El incremento del calcio citosólico produce la activación de diversos enzimas dependientes de calcio y concretamente de la calcio-calmodulina quinasa II, CaMKII, enzima que se encuentra ampliamente distribuida en toda la topografía de la neurona granular. Este enzima al activarse se auto-fosforila y mediante anticuerpos contra la forma fosforilada se pueden detectar las zonas mas activas en la célula. Cuando se estimula con UDP, la CaMKII fosforilada aparece fundamentalmente asociada al soma neural, con mucha menor actividad en las prolongaciones axodendríticas, lo que se corresponde con la distribución de los receptores P2Y₆ funcionales.

Palabras clave: Neuronas granulares.—Cerebelo.—Receptores de nucleótidos.—Receptores P2Y.—Purinérgico.—CaMKII.—Señal de calcio.

ABSTRACT

Cultured granule cells from cerebellum exhibit nucleotide metabotropic receptors such as the P2Y₆ subtype, which physiological agonist is the uridine

diphosphate, UDP. The PCR analysis show the presence of P2Y₆ messenger RNA, increasing with the days in culture. Single cell microfluorimetric studies show cytosolic calcium increase in response to UDP, this being more significant at the soma level. The cytosolic calcium increase triggers cellular responses mediated by calcium dependent enzymes. This is the case for calcium-calmodulin kinase II, CaMKII, which is extensively distributed through the granule neuron, according the immunocytochemical studies. This enzyme once activated is able to auto-phosphorylate and by using antibodies against the phosphorylated form the active zones can be detected. After UDP stimulation, the location of the phosphorylated form of CaMKII appears to be mainly at the neural soma, with lower presence at the axodendritic prolongations, which correlates with the functional P2Y₆ subtype receptor distribution.

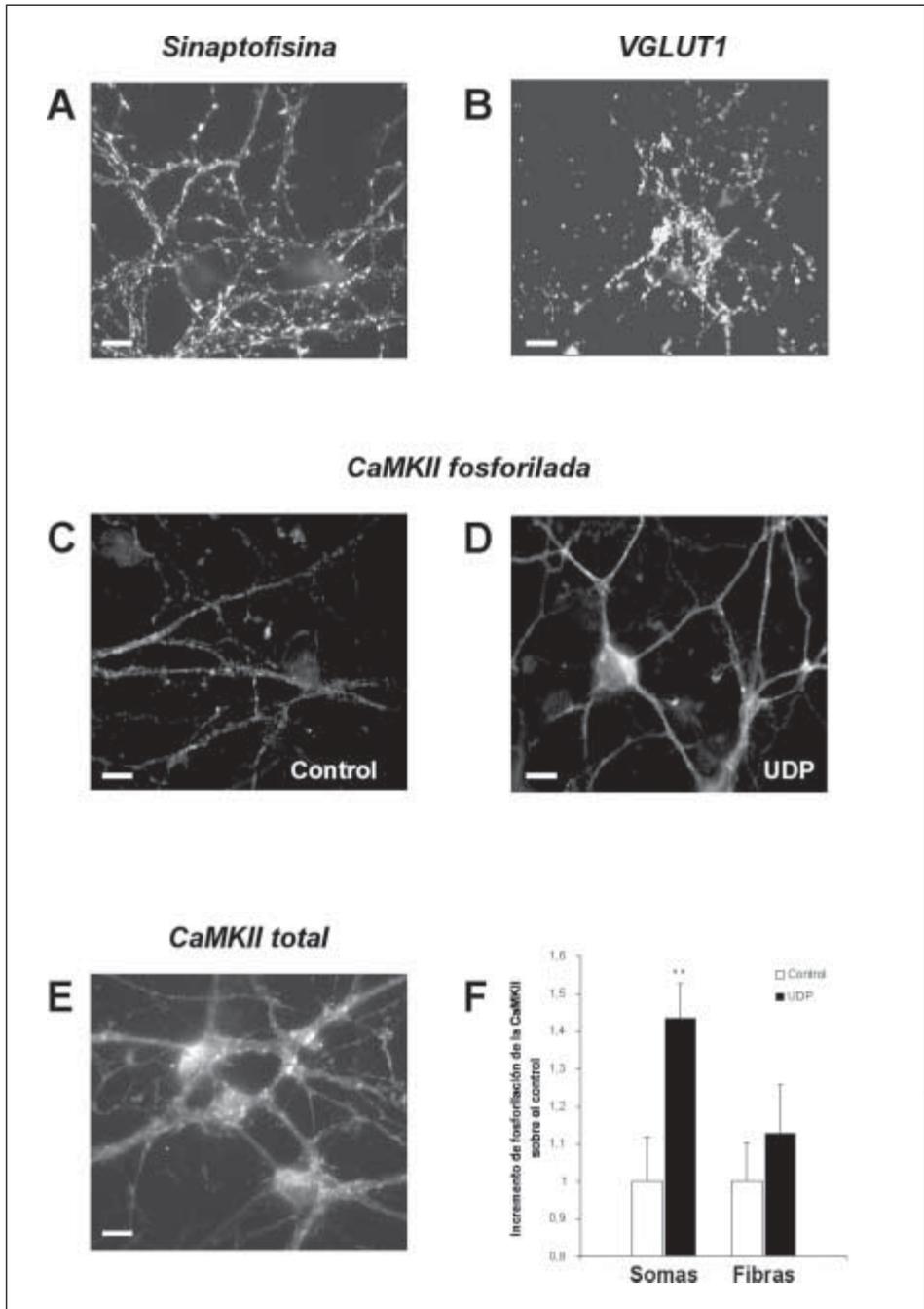
Key words: Granule neurons.—Cerebellum.—Nucleotide receptors.—P2Y receptors.—Purinergetic.—CaMKII.—Calcium signaling.

En el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados se encuentra el cerebelo que tiene una estructura relativamente sencilla y repetitiva, lo que permite identificar con cierta facilidad sus tipos celulares. La corteza cerebelosa se divide en tres capas, la más externa o molecular, la intermedia donde están los somas de las neuronas de Purkinje, y la granular donde están las células denominadas granulares, por su pequeño tamaño y la forma redondeada de su soma. En los mamíferos el cerebelo es inmaduro al nacer, lo que permite realizar cultivos primarios de sus neuronas (Mateo y col., 1998). En la rata las neuronas granulares se pueden obtener antes de los 7 días de edad y una vez en cultivo se diferencian y adquieren morfologías complejas. En trabajos previos del grupo hemos caracterizado estos cultivos y demostrado la naturaleza glutamatérgica de las neuronas granulares mediante inmunohistoquímica. La presencia del transportador de glutamato, VGLUT1, que es un marcador de vesículas de secreción neural identifica las neuronas con fenotipo glutamatérgico (Hervás y col., 2003).

Las neuronas granulares en cultivo se pueden emplear para estudios de diferenciación, expresión de diversas proteínas, como receptores, etc., y para respuestas funcionales en poblaciones o en células individuales. Es de destacar que son un valioso utensilio para el ensayo de compuestos con potencialidad farmacológica en el sistema nervioso, y proporcionan la posibilidad de estudiar los efectos en

poblaciones neurales homogéneas. En este modelo se demostró la presencia de receptores funcionales para nucleótidos, tanto ionotrópicos denominados P2X, como metabotrópicos denominados P2Y, siendo la mayoría capaz de incrementar los niveles intracelulares de calcio. Hasta el momento se han caracterizado siete subunidades de receptores P2X₁₋₇, que se asocian como homo u heteroligómeros, lo que permite la formación del poro iónico para la entrada de los cationes Na⁺ y Ca²⁺. El agonista fisiológico para todos los receptores P2X caracterizados hasta el momento es el ATP. Los receptores P2Y son una amplia familia que contiene 8 miembros, P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}, que pueden responder a diversos nucleótidos según el subtipo. Los P2Y_{1,12,13} responden fundamentalmente a ADP, mientras que el P2Y₁₁ parece ser el más exclusivo para el ATP, el P2Y₂ responde a ATP y UTP, y el P2Y₄ a UTP y en rata también a ATP. El P2Y₆ responde exclusivamente a UDP, finalmente el P2Y₁₄ es activado por las formas activas de los azúcares, como la UDP-glucosa (Burnstock, 2005). Todos los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, que pueden activar diversos sistemas efectores, el P2Y₁₁ acoplado a G_s es capaz de activar la adenilato ciclasa de membrana, mientras que los P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, que están acoplados a G_i inhiben la adenilato ciclasa. El resto de los receptores de nucleótidos, P2Y_{1,2,4,6} están acoplados a G_q y activan la cascada de señalización de la fosfolipasa C, PLC, que hidroliza el fosfatidilinositol bisfosfato produciendo diacilglicerol e inositoltrisfosfato, IP3. Este metabolito, produce la salida de calcio del retículo, que junto con el diacilglicerol inducen posteriormente la activación de proteína quinasa C y otras cascadas de proliferación o diferenciación celular, según el tipo de célula (Neary y col., 2003).

Un enzima de especial relevancia en neuronas e implicada en los procesos de reorganización del citoesqueleto es la Calcio Calmodulina quinasa II, CaMKII. Este enzima es muy abundante en cerebro, donde constituye entre un 1-2% de la proteína total. Funcionalmente es una serina treonina quinasa, que necesita la presencia de la calcio calmodulina para su activación. El enzima una vez activado se autofosforila, permaneciendo activa aunque desaparezca la señal de calcio. Esto permite que pueda coordinar una gran variedad de funciones, tanto en la excitabilidad de la membrana, como en el metabolismo. Se puede localizar tanto presináptica, como post-sináptica-



mente y es uno de los enzimas clave en la plasticidad neuronal requerida para el aprendizaje y la memoria (Bayer y Schulman, 2001).

Debido a la existencia de un elevado número de receptores para nucleótidos, en este trabajo nos hemos centrado en el receptor P2Y₆ y trataremos de demostrar que está presente en neuronas granulares, que es funcional y que su activación produce un incremento de calcio en el citosol celular, lo que lleva emparejada la activación de la CaMKII.

Los cultivos de células granulares han sido descritos en trabajos previos del grupo (Hervás y col., 2003). En la figura 1 se puede observar un cultivo típico. La inmunohistoquímica con anticuerpos contra el marcador de vesículas neurales, sinaptofisina (anticuerpos de la casa comercial Sigma), confirma la naturaleza neural de las células y la ausencia de células contaminantes (figura 1 A). La inmunohistoquímica positiva con respecto al marcador de vesículas glutamatérgicas, el VGLUT-1 (de la casa comercial Synaptic systems), nos confirma la naturaleza de neuronas glutamatérgicas, que son las granulares de cerebelo (figura 1 B). En las figuras 1C y 1D podemos observar el inmunomarcaje con el anticuerpo para la forma fosforilada de la CaMKII (anticuerpos contra el epítipo de rata realizados en conejo, de la casa comercial Upstate). En 1C se muestra el control sin estimular con el agonista, el nucleótido de uridina UDP (Sigma). En 1D se muestran las células granulares después de activar con el

FIGURA 1. *Las neuronas granulares de 14 DIV se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% tras lo cual se incubaron con anticuerpos específicos. (A) Inmunodetección de la sinaptofisina (Sigma) 1:200 utilizando un anticuerpo secundario acoplado a FITC (Sigma) 1:500. (B) La identificación del transportador vesicular de glutamato VGLUT1 con el anticuerpo anti-VGLUT1 (Synaptic Systems) 1:1000 se reveló con TRITC (Sigma) 1:500. Las neuronas se estimularon con un medio control (C) y con UDP 100 μ M (D) durante 5 minutos y se fijaron para obtener el inmunomarcaje con el anticuerpo para la Calmodulina quinasa II fosforilada (Upstate) 1:100. El marcaje de la CaMKII total (Zymed) 1:100 se muestra en (E). La barra de escala corresponde a 5 μ m. (F) Las barras muestran los porcentajes de incremento \pm SEM en la intensidad de fluorescencia sobre el control sin tratar ejercido por el UDP y medido en cuerpos celulares y fibras. Para cuantificar la fluorescencia se promedió, utilizando el programa Lucida Analysis, los niveles de grises correspondientes a regiones tomadas sobre los somas y las fibras por separado. N=3 cultivos distintos; 6-8 imágenes por tratamiento y cultivo.*

agonista. Es de destacar que no todas las células responden y que además la distribución en la topografía neuronal es muy restringida, siendo especialmente marcada en el soma y mas escasa en las prolongaciones axo-dendriticas de las neuronas en cultivo. Sin duda esta distribución tiene un significado funcional y circunscribe la acción de los receptores a lugares definidos de la célula. En la figura 1E se puede observar la gran abundancia de CaMKII, ya que el anticuerpo reconoce el enzima fosforilado y sin fosforilar. Tanto el soma como las prolongaciones axo-dendriticas contienen gran cantidad del enzima, pero según cual sea la distribución de los receptores que movilizan calcio, se activará la CaMKII que esté localizada en la proximidad. En la figura 1F se representa mediante barras la incidencia relativa en la activación de la CaMKII del soma y de las fibras en respuesta al UDP.

La presencia de la CaMKII en su forma fosforilada después de estimular con UDP, sugiere la presencia de receptores P2Y₆ funcionales. Para confirmarlo, se han realizado estudios de PCR en células granulares en cultivo, con la pareja de oligonucleótidos en sentido de avance y en sentido reverso; secuencia CGTGAGGATTT-CAAGCGACTG (*forward primer*) y secuencia CCAAACGACTCCACA-TACCA (*reverse primer*). El fragmento se corresponde en PCR con un tamaño de 371 pares de bases. La expresión se compara a los 7 y 14 días en cultivo, y también con astrocitos en la figura 2A. En la figura 2B pueden observarse mediante estudios de microfluorimetría realizados en célula individual la gran variedad de respuestas a nucleótidos. La técnica de microfluorimetría ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio para estudios en células y terminales nerviosos individuales (Díaz-Hernández y col., 2001). En este caso las neuronas granulares se incuban con el marcador fluorescente para calcio Fura-2AM (Molecular Probes). Una vez cargadas las células, se lavan y se sitúan en una cámara de perfusión, bajo el microscopio de fluorescencia, dónde son sometidas a la acción de diversos compuestos de modo secuencial. La emisión de fluorescencia a 510 nm, cuando son estimuladas a una longitud de onda de 340 nm y de 380 nm es recogida en una cámara de videoimagen. El cociente de la emisión a cada longitud de onda 340/380, se transforma en concentración de calcio, mediante la ecuación de Grynkiewicz realizando una calibración con un patrón de calcio de

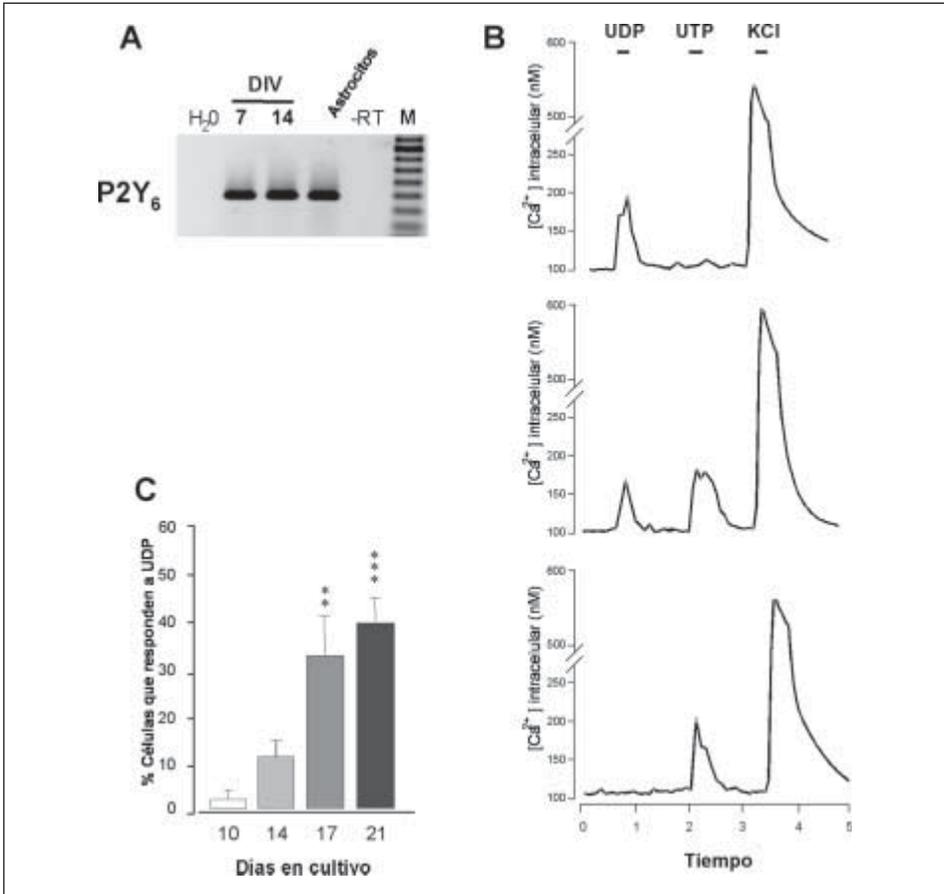


FIGURA 2. (A) Los productos de PCR del receptor P2Y₆ obtenidos a 7 y 14 días de cultivo, se separaron en geles de agarosa al 2 %. Se hicieron controles con agua (H₂O) en lugar de cDNA molde y controles adicionales en ausencia de transcriptasa inversa (-RT). Como control positivo de la expresión de receptores P2Y₆ se emplearon extractos de RNA de cultivos de astrocitos (Ast). M = marcador de 100 pb (n = 3 cultivos diferentes). (B) Las células en cultivo (14 DIV) se cargaron con la sonda Fura-2 y se estimularon con UDP y UTP a 100 μM durante 30 segundos cada uno, dejando 5 minutos de recuperación entre aplicaciones consecutivas. Las células se estimularon al final del experimento con KCl 30 mM para comprobar su estado funcional. Los incrementos de calcio intracelular se calcularon a partir del ratio F₃₄₀/F₃₈₀ con la ecuación de Grynkiewicz. (C) Los diagramas de barras muestran la media ± SEM del porcentaje de células que responden a UDP 100 μM, medidas en los días 10, 14, 17 y 21 de cultivo. Diferencias significativas respecto al control correspondiente al porcentaje de células que responden a cada nucleótido en el día 10 de cultivo: **P<0.01, ***P<0.001. N= 4-6 cultivos; 100-200 células por estadio y cultivo.

concentración conocida. Estos estudios confirman la presencia de múltiples receptores ionotrópicos y metabotrópicos funcionales y la gran diversidad entre células. La presencia del P2Y₆ funcional se observa claramente en la respuesta de calcio a UDP, que no se altera al eliminar el calcio extracelular (resultados no mostrados), indicando que la movilización de este ión procede del retículo. También es de destacar la importancia de los días en cultivo en la aparición de las respuestas y en su magnitud. En la figura 2C, el gráfico de barras muestra la variación obtenida con respecto al tiempo de las células en cultivo y su importancia fisiológica en la maduración.

Una situación de gran complejidad en la respuesta a nucleótidos se produce en los astrocitos de cerebelo, en donde, mediante las técnicas de microfluorimetría y de PCR se ha demostrado la presencia de todos los receptores metabotrópicos P2Y clonados hasta el momento (Jiménez y col., 2000). En estas células los receptores P2Y, incluido el P2Y₆, son capaces de activar las vías de supervivencia y proliferación celular, a través de las cascadas de señalización de ERK. Este receptor está presente en un gran número de tejidos, en los monocitos del sistema inmune induce la producción de interleucina-8 en respuesta al lipopolisacárido y por extensión en situaciones de infección bacteriana. También se expresa en los linfocitos T que se infiltran en el intestino en la enfermedad de Crohn. La presencia del P2Y₆ en las arterias cerebrales se ha tratado de relacionar con la contracción reduciendo el flujo sanguíneo (Malmström y col., 2003). Analizado el tejido cerebral en su conjunto el receptor P2Y₆ es una señal de maduración, pero no el único. En este mismo modelo neural se ha descrito la modificación en la expresión de otros receptores metabotrópicos, como los de glutamato y los de adenosina A₁ (Hervás y col., 2003).

En el presente trabajo se añade un dato más a tener en cuenta para los receptores de nucleótidos en general y para el P2Y₆ en particular, y es su capacidad para movilizar la salida de calcio del retículo y consecuentemente activar las cascadas de señalización a través de la CaMKII. En la figura 3 se presenta un esquema de los efectos del UDP activando los receptores P2Y₆, y las cascadas de señalización que implica.

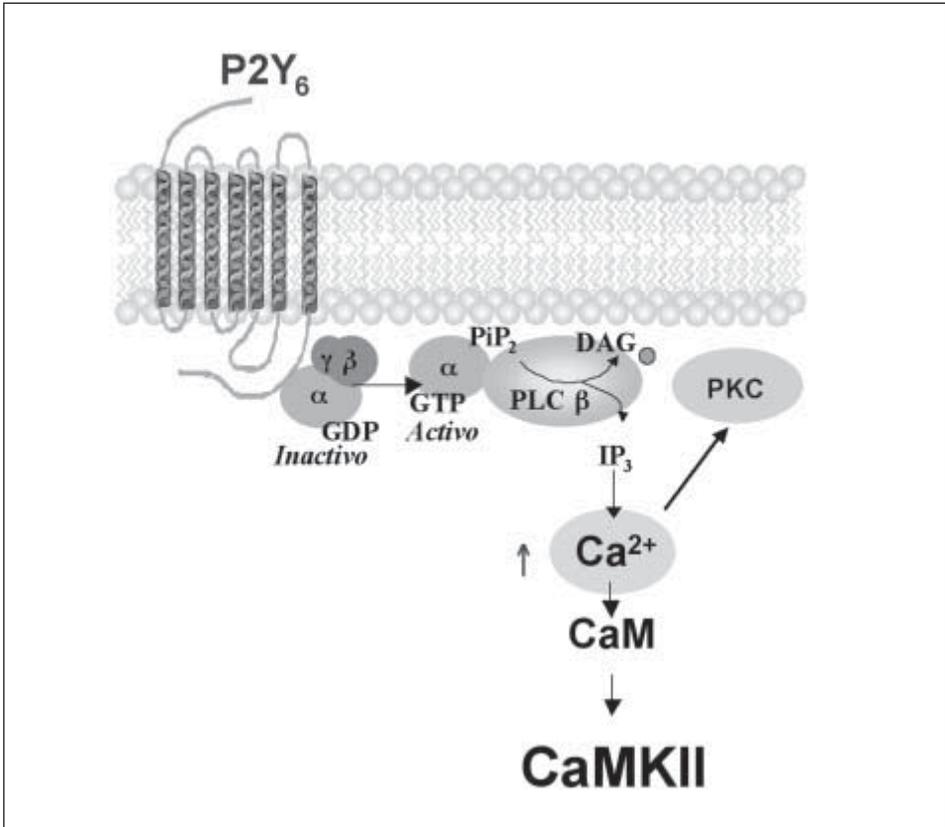


FIGURA 3. Cascada de señalización activada por los receptores P2Y₆. De forma general se considera que los receptores P2Y están acoplados vía proteínas G a la PLC, induciendo la movilización de calcio intracelular y, como consecuencia, la activación de la PKC. De forma secundaria se ponen en marcha mecanismos posteriores de señalización, entre los que se encuentran la activación de la Calmodulina quinasa II.

Actualmente se conoce la existencia de microdominios de membrana, que son lugares de localización preferente de receptores y sistemas de transducción en la membrana plasmática, lo que haría más específicas y restringidas las respuestas. Como hemos señalado en la figura 1D, la forma fosforilada de la CAMKII, después de estimulación con UDP, parece más restringida al soma, o por lo menos más prominente. Esto indica que sus funciones a nivel de las terminales presinápticas, de reorganización del citoesqueleto y aproxima-

ción de nuevas vesículas para sucesivas etapas excitóticas, serían escasamente reguladas por el receptor metabotrópico P2Y₆. Esto está de acuerdo con datos recientes de Hervás y col. (2004), en donde se describe la importancia de los receptores ionotrópicos de nucleótidos, fundamentalmente P2X₃ y P2X₇, a nivel presináptico, en la activación de la CaMKII. Este enzima es importante también en el desarrollo donde promueve cambios morfológicos en las espinas dendríticas e induce sinaptogénesis, siendo también capaz de fosforilar receptores ionotrópicos, permitiendo que las membranas sean funcionales y respondan a los diferentes estímulos nerviosos (Muller y col., 1997).

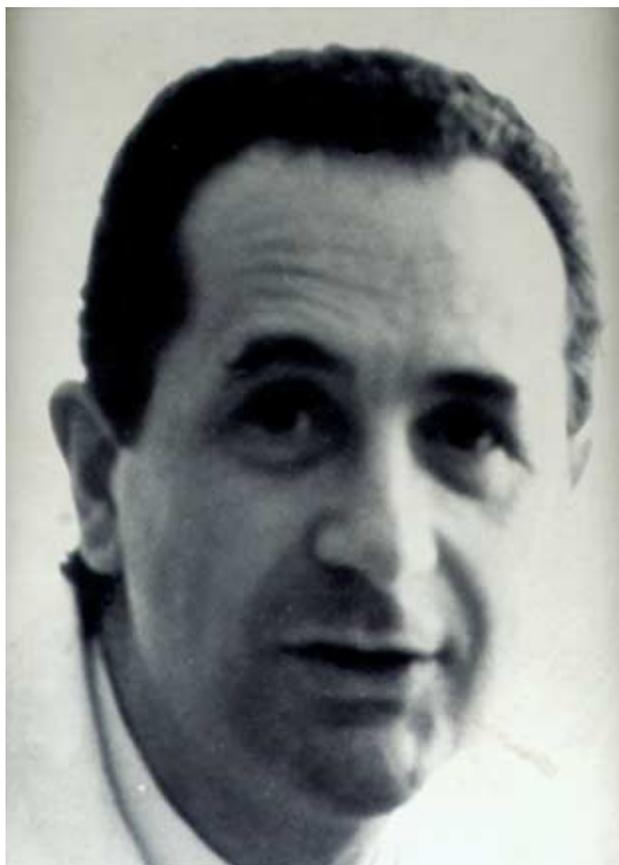
Es necesario incidir en que las neuronas granulares de cerebelo son glutamatérgicas y que en las terminales sinápticas de idéntica naturaleza, aunque de otras zonas cerebrales, se ha descrito la abundante presencia de receptores ionotrópicos para nucleótidos, que son funcionales e inducen la liberación excitótica de glutamato (Gualix y col., 2003). La implicación de los receptores de glutamato en procesos de excitotoxicidad junto con la excesiva presencia de calcio en el citosol neural son aspectos importantes que necesitan ser controlados para evitar el estrés y muerte celular. Uno de los modos de controlar la entrada de calcio y permitir que solamente actúe en los lugares precisos es el localizar los receptores en lugares definidos de la célula, y en este trabajo hemos querido demostrar que esa es la situación con el receptor metabotrópico de nucleótidos P2Y₆.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BAYER, K. U.; SCHULMAN, H. (2001): Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem Biophys Res Commun*; 289 (5): 917-23. Review.
- (2) BURNSTOCK, G. (2005). Purinergic signaling: therapeutic potential. *An. R. Acad. N. Farm.*
- (3) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001): Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *European journal of Neurosciences*, 14, 918-926.

- (4) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003): Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87, 160-171.
- (5) HERVÁS, C.; PÉREZ-SEN, R. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003): Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neuroscience research.* 73, 384-399.
- (6) HERVÁS, C. (2004). Receptores de nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo de rata: tipos y señalización. Tesis doctoral, UCM.
- (7) JIMÉNEZ, A. I.; CASTRO, E.; COMMUNI, D.; BOEYNAEMS, J.-M.; DELICADO, E. G. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2000): Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 71, 2071-2079.
- (8) MALMSJO, M.; HOU, M.; PENDERGAST, W.; ERLINGE, D.; EDVINSSON, L. (2003): The stable pyrimidines UDPbetaS and UTPgammaS discriminate between contractile cerebrovascular P2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 458 (3): 305-11.
- (9) MATEO, J.; MARTÍNEZ DE LECEA, M.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. AND CASTRO, E. (1998): Ca²⁺ signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience.* 18. 1704-1712.
- (10) MULLER, A.; DERKACH, D.; GRIFFITH, V.; SODERLING, L. C. (1997): Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* 276 (5321): 2042-5.
- (11) NEARY, J. T.; KANG, Y.; WILLOUGHBY, K. A.; ELLIS, E. F. (2003): Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci.* 23: 2348-56.

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo



El Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo nació el día 28 de enero de 1920 en Villagarcía de Arosa (Pontevedra). Tomó posesión como Académico de Número el día 14 de marzo de 1985, de la Medalla número 40. Falleció el día 7 de septiembre de 2004. La Sesión Necrológica se celebró el día 3 de marzo de 2005, participando los Excmos. Sres. Académicos: D. Antonio Doadrio López, D.^a Carmen Avendaño López, D. Antonio Doadrio Villarejo y D. Julio Álvarez-Builla; y presidida por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Gregorio González Trigo: mi último adiós a un gran amigo inolvidable

ANTONIO DOADRIO LÓPEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Conocí a Gregorio González Trigo al iniciar mis estudios de la carrera de Farmacia, nada más terminar nuestra guerra, ya que fuimos compañeros de clase en los cursos intensivos que organizó el ministro de educación Ibáñez Martín con el fin de recuperar una parte del tiempo en que estuvo cerrada la Universidad de Madrid sin impartir cursos de todas las carreras. Enseguida entramos en contacto en los estudios de la licenciatura de Farmacia, en este mismo edificio, pues no se había iniciado el traslado de la Facultad de Farmacia al nuevo edificio en la Ciudad Universitaria. Después de este primer contacto, seguimos ambos en la Facultad como Profesores Ayudantes, él en la Cátedra de Química Orgánica, cuyo Catedrático titular era D. Cándido Torres, y yo en la de Química Inorgánica, con el catedrático D. Ricardo Montequi, que fue después Académico de Número y Director de esta Academia, como puede observarse en la pintura al óleo que existe de él en la sala de Actos contigua.

Como muestra del impacto que ocasionó mi amistad con Gregorio, puedo indicar que mi padre, que seguía con gran interés mis estudios de Farmacia y los de mi hermano como Ingeniero de Caminos, al enseñarle las notas de calificación de las asignaturas con matrícula de honor —esfuerzo que realizaba para que me saliese gratis la matriculación de un nuevo curso— me preguntaba: ¿Qué nota ha obtenido Trigo?

Además de mi relación con Gregorio en la Facultad de Farmacia, tuvimos una amistad más íntima, ya que mi mujer se hizo amiga de la de Gregorio y era frecuente que fuéramos a su casa o bien a cenar ambos matrimonios a un restaurante.

Con estos antecedentes se puede comprender el gran dolor y tristeza que me ha producido su fallecimiento, el de ese gran amigo que fue siempre para mí inimitable y siempre estará presente dentro de mí y de mi corazón.

Gregorio González Trigo: El amigo y el docente

ANTONIO DOADRIO VILLAREJO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Sr Presidente, Excmo./as. Sres y Sras. Amigos todos:

Hoy estamos aquí reunidos para hacer uno sólo, en comunidad, con la noble misión de honrar la memoria de una persona ejemplar, el Profesor Gregorio González Trigo.

En el principio no existía nada. Y dijo Dios: Hágase... Y creó el universo, la naturaleza y al ser humano, hombre y mujer los creó. De Él venimos y a Él volvemos cuando llega el momento.

El Profesor González Trigo era un hombre profundamente católico. Sus creencias y formación de raíces cristianas, junto con la satisfacción que indudablemente ejercía en él sus vivencias en familia, tertulias incluidas al mediodía, le hacían ser una persona feliz. Jamás vi en él un mal gesto, una mala contestación o un desprecio. Gregorio no planteaba problemas, contaba a su problema, lo grande que era. Siempre dispuesto a ayudar al que lo necesitaba, practicaba la frase de San Agustín: “Si precisas una mano, recuerda que yo tengo dos” y “Si quieres conocer a una persona, no le preguntes lo que piensa sino lo que ama”, así como las de Santo Tomás: “El amor ilumina el corazón” y “Hay más amistad en amar que en ser amado”.

Creo que conocí al Profesor González Trigo desde el mismo momento en que nací, aunque yo no tuviera por aquel entonces conciencia del hecho, ya que según me contaron mis padres me visitó pocas horas después de mi nacimiento. Después asistió a mi bautizo

y a mi Primera Comuni3n, de lo que en verdad, tampoco me acuerdo. Desde que tengo uso de raz3n, aunque no s3 bien desde cu3ndo, me interes3 Gregorio, como el amigo de mi padre, siempre atento, amable y cari3oso, adem3s de estar rodeado de sus hijos y de su inseparable mujer. Recuerdo que jugaba con sus hijos, en su casa de la colonia de Mirasierra y despu3s en el jard3n de su casa de Puerta de Hierro, donde con el tiempo esos juegos se tornaron en c3nticos, guitarra en mano y ba3os en la piscina de su urbanizaci3n, mientras los mayores hablaban de temas cient3ficos o caseros, o a lo mejor de nuestra educaci3n y comportamiento, vaya uno a saber.

Ejemplar padre de familia, supo inculcar en sus hijos su esp3ritu, que me consta, les acompa3a y vivir3n con 3l para siempre. Desde su familia, de la que tambi3n me consta, irradiaba su felicidad, se proyectaba hacia los dem3s. Ya dijo S3focles que "el que es bueno en familia, es tambi3n un buen ciudadano". Como no pod3a ser menos, a m3 tambi3n me influy3 en su esp3ritu. Pas3 conmigo, lo que dijo Espinel: "Har3 con vuestra merced lo que con mis amigos, que es en la elecci3n aconsejarles lo mejor que s3, y en la determinaci3n ayudarles lo mejor que puedo". Ahora, soy mejor, s3lo por el hecho de haberle conocido.

Gregorio era un modelo de amigo. En la Biblia se puede leer: "Un amigo fiel es la medicina de la vida". Gregorio fue siempre un amigo fiel para toda mi familia y un remedio para los males que padecemos hoy en d3a, sobre todo el de la soledad, a pesar de la superpoblaci3n de nuestro Planeta. Con Gregorio uno no se sent3a solo, porque 3l practicaba el dicho de Vives: "Sal de la vida es la amistad". Por el contrario, para los amigos de Gregorio, rezaba la cita de Voltaire: "Cambiad de placeres pero no cambi3is de amigos", ya que, seg3n el Eclesiast3s: "El amigo fiel es un resguardo poderoso; quien lo tiene, tiene un tesoro". Y un tesoro encontr3 mi padre con la amistad de Gregorio, que estuvo con 3l, incluso en los dif3ciles momentos de la transici3n, cuando siendo mi padre Decano de la Facultad de Farmacia, acept3 a ser vicedecano y le acompa3o en todo momento, dando una muestra de amistad y compa3erismo, que ni mi padre ni toda mi familia podr3 olvidar. Por entonces, yo estaba terminando mi carrera en la Facultad de Farmacia, y ya ten3a uso de raz3n, o al menos el suficiente para entender el valor de esa amistad. Como

decía el poeta soldado Quinto Ennio: “El amigo seguro se conoce en la ocasión insegura”.

Pero retrocedamos un poco en el tiempo, y sin darme cuenta, me encuentro estudiando Farmacia en la UCM, y allí surge mi imagen del profesor, al que todos admiramos y respetamos, a pesar de que la Química Orgánica era ya entonces, y sigue siéndolo, uno de los más difíciles huesos de roer en nuestra carrera. Por aquel entonces, empezó el curso como Profesor Agregado y a mitad del mismo obtuvo la cátedra. Recuerdo que fui a verle en compañía de José Ángel Navarro, hijo de otro admirado profesor de la Facultad de Farmacia, y al darle la enhorabuena, le dije: “Estarás contento por la cátedra, verás de otra forma la vida”. Él me contestó con sencillez: “Bueno, es un día más de trabajo”. Esto resumen lo que era el Profesor González Trigo, sencillo, humano y trabajador infatigable, haciendo bueno el “Nada hay inaccesible a los mortales” de Horacio.

Gregorio perteneció a aquella generación de la posguerra, de las privaciones y el pluriempleo, que él también y tan bien ejerció, tanto en la Facultad como en la Calvo Sotelo y que a pesar de las grandes limitaciones de aquellos tiempos, fueron capaces de elevar a España, con su esfuerzo y sacrificio, hasta alcanzar un nivel de bienestar, que pareció truncarse en nuestra incipiente democracia, incapaz al principio de demostrar que con ella también se podía llegar a alcanzar ese bienestar, hasta que el último gobierno del Partido Popular demostró que con la democracia también era posible el desarrollo económico de España. Al contrario que en la etapa del pelotazo y el dinero fácil, esa generación trabajó para hacer buena la frase de Addison: “Nada que se consiga sin pena y sin trabajo es verdaderamente valioso”.

Otro de los grandes amores del Profesor González Trigo fue esta Real Academia, desde cuyo estrado me dirijo a ustedes. En el prólogo de su discurso de recepción como Académico de Número, el 14 de marzo de 1985, que versó sobre las conquistas de la síntesis orgánica, dijo: “La Academia ocupa en el saber el último peldaño y quien lo alcanza, consigue un alto honor”.

La contestación a este discurso corrió a cargo de su gran amigo, mi padre, y al leer parte de sus palabras en ella vertidas, sirva de homenaje y muestra del cariño y admiración que mutuamente se

tenían: “Porque en este acto académico cumplo con otra petición, menos formalista, y más afectiva y humana: la de un compañero, un amigo, con el que inicié mis andaduras universitarias hace ya más de 40 años en este mismo lugar, entre estos muros que durante varios años albergaron nuestras ilusiones y nuestras esperanzas y en el que se fue forjando nuestra formación humana y científica”. Y más adelante: “...La historia de un hombre de firmes convicciones, de voluntad decidida, que con tesonera laboriosidad ha conseguido abrir el camino que desde siempre tenía trazado, a pesar de las grandes dificultades que a ello se oponían. La fe y esperanza que mantuvo le ha conducido finalmente al puesto que deseaba”.

Las vidas de ambos maestros transcurren paralelas y casi sincronizadas. Compañeros de curso, realizaron simultáneamente los exámenes de Premios Extraordinarios de Licenciatura y Doctorado, y los concursos oposiciones de Profesores Adjuntos y Profesores farmacéuticos del Laboratorio Municipal, y con poca diferencia en el tiempo las de Catedrático y Profesor Agregado en la Facultad de Farmacia de Madrid, para terminar reunidos en esta Corporación como Académicos de Número.

Quizás, el momento culminante de su presencia en esta Institución, lo marcase el encargo del discurso de inauguración del Curso 1988, que recibe de la Sección de Farmacotecnia. Su discurso, hoy felizmente recuperado en nuestra página web, lo tituló “Del complejo droga al fármaco estructuralmente específico”, donde aborda con valentía el problema del diseño y obtención de nuevos fármacos, haciendo hincapié en que el modelo más realista era la variación estructural de algo existente, con la esperanza de mejorarlo. También decía que el mecanismo bioquímico de una enfermedad constituye una de las aproximaciones más sensatas de las que disponemos, para el desarrollo de nuevos fármacos, y hacía mención a que el estudio estructural de proteínas permite formular hipótesis de trabajo sobre cómo actuarían los receptores. Todo ello, de plena vigencia hoy en día, aún empleando otros términos.

Para terminar, he elegido citar a Kahlil GIBRAM:

En verdad os digo que el adiós no existe: si se pronuncia entre dos seres que nunca se encontraron, es una palabra innecesaria.

Si se dice entre dos que fueron uno, es una palabra sin sentido.

Porque en el mundo real del espíritu sólo hay encuentros y nunca despedidas, y porque el recuerdo del ser amado crece en el alma con la distancia, como el eco en las montañas del crepúsculo.

Gregorio, tu fuiste trabajo y amor. Tu recuerdo no se borrará de nuestra memoria.

He dicho.

— *Necrológica* —

El Profesor González Trigo: esfuerzo, constancia y talento

M.^a CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Todo pasa. Pasan pompas y vanidades.
Pasa la nombradía como la oscuridad.
Una sola cosa te será contada
y es Tu Obra Bien Hecha”

EUGENIO D'ORS

Excmo. Sr. Presidente, Excmos. Señoras y Señores Académicos, queridos familiares y discípulos del Dr. González Trigo, Señoras y Señores:

Hoy queremos rendir homenaje a uno de los Académicos Numerarios de esta Real Academia que han fallecido el año 2004, y por ello nos reunimos familiares, amigos, compañeros y discípulos del Dr. D. Gregorio González Trigo. He cumplido gustosa el encargo de la Academia para organizar este acto contando con inestimables colaboraciones. En primer lugar, la del Dr. D. Antonio Doadrio López, Académico de Número de esta Corporación que fue compañero y amigo de D. Gregorio desde sus estudios de Licenciatura. En su nombre, se ha glosado entre otros aspectos, la labor del Profesor González Trigo como Académico de esta Real Corporación. Mi agradecimiento también para el Profesor D. Julio Álvarez-Builla Gómez, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá, que fue alumno de D. Gregorio, iniciándose en la investigación y dando sus primeros pasos en la carrera académica dentro del Grupo que

aquél aglutinó en la Facultad de Farmacia de Madrid. Él comentará desde el exterior la labor investigadora de nuestro homenajeado. Finalmente, también quiero agradecer los datos aportados por Javier González Esteban, el único de entre los cinco hijos de D. Gregorio que es Licenciado y Dr. en Farmacia, así como la colaboración del Dr. Menéndez Ramos, Académico Correspondiente, que pertenece a una nueva generación de profesores derivada de dicho Grupo. Si comprender la propia vida es difícil, acercarse a la vida de una persona que ha influido en la nuestra produce, al menos este es mi caso, un sentimiento de enorme pudor. Las trayectorias personales y profesionales no transcurren por vías paralelas, y las decisiones que adoptamos están influidas por circunstancias que a veces escapan a nuestra voluntad. Para acercarnos a comprender la trayectoria vital de D. Gregorio me ha parecido oportuno situarla dentro del panorama que atravesaba en su momento la Química Orgánica, especialmente la española.

Breve historia de la Química Orgánica en la Facultad de Farmacia de Madrid

Hasta finales del siglo XIX no existían propiamente en nuestro país profesionales químicos, y la investigación química se realizaba fundamentalmente por farmacéuticos. D. Manuel Rioz y Pedraja y D. Santiago de Olozaga y Fodrán fueron los dos primeros Catedráticos de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la U. Central¹. Más que “hacer ciencia”, la principal labor de estos químicos era “hablar de ciencia”². En 1881 tomó posesión de dicha cátedra el Profesor D. José Rodríguez Carracido, que fue junto con Cajal el científico más influyente de su generación y alcanzó gran relevancia nacional e internacional. La situación de la Química en España cambió notablemente el año 1900, cuando el recientemente creado Ministerio de Instrucción Pública dotó laboratorios de investigación destinados a algunas autoridades científicas consagradas, una de las cuales fue el Profesor Rodríguez Carracido. En estos laboratorios se podía investi-

¹ La Facultad de Farmacia de la U. Central se creó oficialmente como tal en 1845.

² DE LEÓN, M. y GONZÁLEZ, F. A.: “Mirando hacia atrás”, *La Gaceta de la RSME*, 2002, 5, 779-809.

gar en química de forma semejante a como se practicaba en los países de nuestro entorno, lo que servía con frecuencia para iniciarse en la vida académica. Pero el hito más notable del desarrollo de la química en España se produjo sin duda en 1907, cuando se creó la Junta para Ampliación de Estudios con el impulso de personalidades científicas como la de D. Santiago Ramón y Cajal³.

La JAE tenía una motivación patriótica y pretendía establecer las bases para desarrollar en nuestro país una docencia y una investigación que rompieran el enorme retraso que existía respecto a los países vecinos. Con este objetivo, pensionó a profesores y a estudiantes con inquietudes científicas para realizar estancias de investigación en laboratorios extranjeros⁴.

Cuando Carracido pasó en 1899 a desempeñar la Cátedra de Química Biológica, que era una asignatura de doctorado⁵, le sucedió en la cátedra de Química Orgánica D. Baldomero Bonet y Bonet, que la ocupó hasta 1925.

La JAE aportó además ingresos para la instalación de laboratorios fuera de la Universidad. Así, creó en 1916 para Antonio Madiaveitia el Laboratorio de Química Fisiológica de la Residencia de Estudiantes, tres años después de que éste leyera su Tesis Doctoral titulada "Los fermentos oxidantes", y mucho antes de su acceso a la Cátedra de Q. Orgánica de la F. de Farmacia en 1925.

Me permito aquí una digresión para comentar que el "pulso" de la sociedad española de la época que estamos considerando con-

³ CABRERA, B.: "La influencia de Don Santiago Ramón y Cajal sobre la juventud española", *Anales de Medicina del Ateneo Ramon y Cajal* (Méjico), 1943, 1, 26-28.

⁴ Éste fue el caso de D. Obdulio, becado en el curso 1911-12 en los laboratorios del Profesor Pictet en Ginebra y del Profesor Wender en Munich, aunque esta estancia centroeuropea no le satisfizo demasiado. Ver DEL CASTILLO, B.: "Publicaciones facsimilares y obras de química y botánica de autores farmacéuticos burgaleses".

⁵ Al Profesor Rodríguez Carracido le sucedió en la Cátedra de Química Biológica D. José Giral Pereira, alguna de cuyas obras (*Análisis orgánico funcional* en 1914 y *Tratado de química orgánica* en 1926-1928) son de Química Orgánica. Además de Rector de la Universidad de Madrid, fue un destacado dirigente de Acción Republicana, Ministro de Marina de 1931 a 1933 y en 1936, Ministro sin cartera de 1936 a 1939 a la vez que Ministro de Estado de 1937 a 1938, Presidente del Consejo de Ministros en el Gobierno de 20 de julio de 1936 y Presidente de los Gobiernos de la República española en el exilio de 1945 a 1947. En su exilio mejicano fue profesor de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN y de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas de la UNAM.

trasta con el actual, en el que se aprecia “una demoledora pasión igualitaria que rechaza la excelencia, ignora el mérito del esfuerzo, desprecia el sufrimiento de la constancia, y niega los frutos del talento”⁶.

Cuando se inauguró en 1932 el Instituto de Física y Química, cuya construcción y equipamiento sufragó la Fundación Rockefeller, encontramos junto a las firmas de relevantes científicos extranjeros, la de Antonio Madinaveitia, que tras su Tesis Doctoral había continuado su formación con Willstätter en Zurich trabajando sobre las reacciones de hidrogenación catalítica. Madinaveitia era en esos momentos Director de la Sección de Química Orgánica de dicho Instituto, al tiempo que ocupaba la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad Farmacia de la Universidad Central. En este último cargo se mantuvo hasta 1939 en que se exilió a Méjico, siendo allí impulsor y Director del Instituto de Química de la UNAM, que fue inaugurado en 1941⁷.

El Profesor D. Obdulio Fernández, que ocupó la Cátedra de Química Orgánica de Granada con 25 años y seis años después la de Análisis de Medicamentos Orgánicos en la Facultad de Farmacia en Madrid, fue compañero de Madinaveitia y, como él, alumno de Rodríguez Carracido. Fue un científico riguroso y un gran maestro, colaborando en algunos textos de Química Orgánica con el Profesor Giral Pereira.

Leyendo sus Memorias⁸ podríamos repasar gran parte del ambiente científico de los años decisivos para la formación de D. Gregorio. En D. Obdulio se da uno de los rasgos diferenciadores que podemos encontrar en los profesores de química de este periodo de tiempo, como es la gran divergencia en los temas de investigación que se acometían, de tal forma que cuando en 1968 la Real Acade-

⁶ Parte del artículo de opinión de MARTÍN FERRAND, M.: “¿Cómo en los años treinta?”, del diario ABC, viernes 21 de enero de 2005.

⁷ El Profesor D. MANUEL LORA-TAMAYO en su libro *La investigación química en España*, editado por Alhambra en 1981, incluye a Madinaveitia entre los químicos españoles dedicados a los productos naturales y a la “síntesis de medicamentos”, señalando que sus estudios sobre la plumbagina se citan en la bibliografía internacional.

⁸ De la lectura de “Recuerdos de una vida”, primer capítulo de estas memorias que se publicó en Farmacia Nueva, Madrid, 1973, se deduce el ostracismo al que se vio condenado en sus últimos años.

mia de Ciencias de Madrid le concedió la Medalla Echegaray, se destacaron sus diferentes aportaciones científicas en el análisis químico (en particular el empleo de la 2,4-dinitrofenilhidrazina como reactivo)⁹, la bromatología (en particular el análisis de aguas de consumo público del Instituto Nacional de Higiene), el estudio de las féculas, ligninas, líquenes y plantas cauchíferas, los trabajos de farmacodinamia y el estudio de distintas enzimas (entonces denominadas fermentos).

También se empezó a considerar en esta época la importancia que tiene para la enseñanza de la química la estancia de los alumnos en los laboratorios de prácticas¹⁰, y a seguir muy de cerca el desarrollo científico que tenía lugar fuera de nuestras fronteras. La presencia internacional de los químicos orgánicos españoles y su relevancia en la sociedad, así como el ímpetu de los profesores de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central, empezaron pronto a hacerse notar. El mismo D. Obdulio, que con tan sólo 40 años era Consejero Nacional de Sanidad, representó a España junto con otros químicos en diversos congresos internacionales, de los que fue relevante el "IX Congreso Internacional de Química", que se celebró en Madrid en 1934 bajo su presidencia y al que asistieron más de 1.500 químicos de prácticamente todo el mundo.

El cataclismo de la Guerra Civil española fue un duro golpe para las universidades y afectó de forma directa o indirecta a la Química Orgánica en las Facultades de Farmacia, no sólo por razones políticas, sino por otros muchos factores. Uno de éstos fue la clara diferenciación entre sus contenidos y los de otras materias que de ellas se disgregaron, como fueron la Bioquímica, la Química Analítica, etc. Según una reciente tesis doctoral en la que se estudia la situación de la universidad española en el periodo 1936-1945¹¹, el proceso de desmantelamiento de la institución universitaria empezó con la purga de los que se consideraron desafectos al nuevo régimen,

⁹ Ver, por ejemplo, la determinación cuantitativa de compuestos carbonílicos a través de la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas, en RODRÍGUEZ, O., SOCÍAS, L.; TORRES, C.: *Anales de Física y Química*, 1932, 30, 447.

¹⁰ AVENDAÑO, C.: "Relevancia de Liebig en el desarrollo de la Química Orgánica", *Anal. R. Acad. Farm.* 2003, LXIX, 613-634.

¹¹ JAUME CLARET, "La represión franquista en la universidad española," Tesis Doctoral presentada en la Universidad Pompeu Fabra, dirigida por Josep Fontana.

de forma que mientras que en 1936 había en España 600 catedráticos, en 1940 había 380. Según este trabajo, la entrada de nuevos docentes se realizó con frecuencia aplicando criterios políticos más que académicos.

Continuando la historia de la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de Madrid llegamos al Profesor D. Cándido Torres González, que precedió a D. Gregorio. D. Cándido, del que guardo un vivo recuerdo, había leído su Tesis Doctoral, dirigida por D. Obdulio y titulada “Ensayos de acetilación mediante el anhídrido acético y el ácido sulfúrico”, en 1922. Se trataba del estudio de diversas reacciones analíticas relacionadas con la acetilación de fenoles. En 1925 D. Cándido realizó una estancia con Fourneau en Francia¹². Los trabajos de éste, especialmente los relativos a los compuestos adrenérgicos, determinaron su interés por la Farmacología, como prueban algunos de sus trabajos sobre la reducción de aminocetonas para sintetizar aminoalcoholes con esta actividad¹³. Cuando en 1940 se trasladó desde la Cátedra de Química Orgánica de Barcelona a la vacante de Madinaveitia en Madrid, su rastro como investigador se desdibuja por razones que desconozco, destacando sin embargo como un excelente docente y por la publicación de varios manuales: las traducciones en 1941 del “Tratado de Química Orgánica” del Profesor Karrer, y la de la obra del mismo título de Holleman y Richter en 1942, así como las tres ediciones de su propio “Tratado de Química Orgánica” (1945, 1951 y 1958-1964).

D. Gregorio González Trigo: breve historia de su vida y de su aportación a la Química Orgánica en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la F. Farmacia de la Universidad Complutense

El Dr. González Trigo nació en Villagarcía de Arosa el 28 de enero de 1920 y falleció en Madrid el 7 de septiembre de 2004.

¹² Fourneau, que era Jefe del Laboratorio de Química Terapéutica del Instituto Pasteur de París, fue invitado por la JAE a la Facultad de Farmacia y dictó un curso teórico-práctico que tuvo gran repercusión.

¹³ Ver a su vuelta la Tesis Doctoral de JOSÉ AMARGÓS: “Sobre la síntesis de oxiefedrinas”, leída en 1933 y realizada bajo su dirección.

Terminó la Licenciatura en Farmacia con premio extraordinario en 1944, formando parte de la primera promoción después de la Guerra Civil española. Esta promoción había seguido el Plan de Estudios de 1931, en el que la Química Orgánica se cursaba en cuarto curso con seis horas semanales. A este respecto, en más de una ocasión D. Gregorio comentó a sus alumnos en clase que ese año dedicó 7 horas diarias al estudio de la Química Orgánica. Su interés por esta materia le llevó a realizar bajo la dirección de D. Cándido Torres su tesis Doctoral “Contribución al estudio de los componentes de la naranja española”, actuando además como Profesor Auxiliar. El 10 de junio de 1947 la defendió, siendo publicada en “Anales de Bromatología” en 1950.

Cuando el 14 de marzo de 1985 tomó posesión de la medalla número 40 en esta Corporación, eligió como tema de su discurso “Las conquistas de la síntesis orgánica”, poniendo de manifiesto su interés por este aspecto de la Química Orgánica y, en particular, por la síntesis de productos naturales. Sin embargo, no era ésta la actividad que realizó en su trabajo de tesis, quizás porque aunque los intereses, objetivos y metodologías de dicha ciencia se dirigían en esa década especialmente a la síntesis de moléculas¹⁴, las nuevas metodologías sintéticas requerían aparatos y equipos con los que el “modesto laboratorio de D. Cándido”¹⁵ no contaba. En este discurso, D. Gregorio habla de D. Cándido en los siguientes términos: “de su mano penetré en el sugestivo, frondoso y siempre atractivo bosque de la química de los compuestos de carbono. Él supo iniciarme en los conceptos estructurales y mecanísticos de los compuestos orgánicos, al máximo nivel que los recursos teóricos de la época permitían.” Sin embargo, aunque carezco de información fehaciente, tengo la impresión de que ambos no llegaron a comprenderse.

Alrededor de los años 50, aunque seguían utilizándose los métodos clásicos de síntesis, surgieron nuevos procesos y reactivos que hoy nos parecen imprescindibles. Entre ellos mencionaremos los reactivos organolíticos y otros organometálicos, que complementa-

¹⁴ La mayoría del progreso en la industria química tuvo lugar tras la segunda Guerra Mundial. Ver C. A. RUSSELL: “Advances in organic chemistry over the last 100 years”, *Annual Reports on the Progress of Chemistry*. Organic Chemistry, 2005, Vol 100, Section B, 3-31.

¹⁵ Esta frase es literal dentro del Discurso de Ingreso anteriormente citado.

ban a los viejos reactivos de Grignard; los reactivos con heteroelementos no metálicos como organofosfinas, organoboranos y organosilanos; reactivos de oxidación y reducción más selectivos, como el hidruro de litio y aluminio o el borohidruro sódico; las primeras síntesis estereoselectivas eficaces, etc. El material con uniones de vidrio esmerilado, que se conocía desde el siglo XVIII pero no se utilizó rutinariamente hasta los años 50, llegó a los laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de Madrid cerca de los años 70. No digamos nada acerca de la instrumentación. Antes de 1940 se utilizaban algunas técnicas cromatográficas, algunos instrumentos ópticos sencillos, y poco más. Los espectrofotómetros se empezaron a comercializar en Europa después de 1945, y a partir de esta fecha la instrumentación fue creciendo exponencialmente de forma que las medidas físicas tuvieron una enorme importancia en el frente teórico, además de en el práctico, y permitieron la convergencia entre la química inorgánica, la orgánica y la química física. Pero nada de esto llegó durante esos años a los laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de Madrid¹⁶.

La aproximación de la química a la medicina, que permitió la explosión de la industria farmacéutica, era consustancial en las Facultades de Farmacia, y de hecho existían relaciones personales y asesoramiento científico por parte de muchos de sus profesores, incluyendo por supuesto al Profesor Torres. En los últimos años de su vida académica, éste se adaptó a las nuevas corrientes organizativas de la Universidad española, formando con la Cátedra de Farmacognosia una unidad que se denominó "Departamento de Química Orgánica, Farmacognosia y Farmacodinamia", pero la ausencia de un interés común y de un programa de trabajo bien establecido no permitieron que esta unidad alcanzara el desarrollo deseado y, en las distintas facultades, la Química Orgánica se mantuvo encerrada dentro de unos estrechos límites. Hubo incluso ciertos recelos cuando la asignatura de Química Farmacéutica se incorporó al plan de estudios haciéndose responsable de la misma a los Departamentos de Química Orgánica. D. Gregorio vivió estas dificultades y también contribuyó a su superación.

¹⁶ En los últimos años 60 empezamos a utilizar un espectrómetro IR en los laboratorios de Q. Inorgánica, si bien seguíamos cursos sobre distintas espectroscopías fuera de la Facultad.

Tras la lectura de su tesis en 1947, el Dr. González Trigo fue Profesor Adjunto de Química Orgánica, Becario de la Sección de Química Orgánica y Farmacéutica del “Instituto Alonso Barba” del CSIC en 1948, y Ayudante de dicho Instituto en 1950. En 1949 se le concedió una beca para ampliación de estudios en el Imperial College de Londres, pero no llegó a realizar dicha estancia por necesidades docentes de la cátedra.

No hago ningún descubrimiento si afirmo que la mayor riqueza y, a la vez, mayor debilidad de la Licenciatura de Farmacia es su multidisciplinariedad, lo que requiere que se sacrifique la formación en ciertas materias para incorporar la de otras. Por tanto, ya entonces no era fácil a un Licenciado en Farmacia abrirse caminos en el campo de la Química Orgánica en competencia con los Licenciados en Química.

La necesidad de alcanzar una situación estable, muy difícil en la vida académica, ya que sólo había cuatro Facultades de Farmacia en España y, por tanto, cuatro catedráticos de cada especialidad, fue la que impulsó a D. Gregorio a compaginar su vocación por la adquisición y transmisión de conocimientos y saberes con otras actividades profesionales, y en 1951 ocupa por oposición una plaza de Inspector Farmacéutico Municipal en el Laboratorio Municipal de Madrid.

En 1953 es nombrado, también por oposición, Técnico Superior de la empresa nacional “Calvo Sotelo”, asociada al Instituto Nacional de Industria (INI), y se le asigna al Centro de Investigación como Jefe del Laboratorio de Química Orgánica. En él lleva a cabo los proyectos de la empresa y otros trabajos motivados por su interés investigador¹⁷. Ni que decir tiene que para simultanear todas estas actividades se requiere una gran organización y capacidad de trabajo, dos cualidades que nadie puede negar a nuestro protagonista. Dicho con las palabras que utilizó el Dr. Doadrio López en su contestación al discurso de Ingreso en esta Academia: “Una vida consagrada al trabajo... tenaz, intenso, pero sobre todo, organizado”.

¹⁷ Las publicaciones y comunicaciones a Congresos de esta etapa tienen como tema la alquilación de fenoles con olefinas, la obtención y polimerización de acetaldehído, el estudio de equilibrio líquido-líquido en sistemas ternarios y el de procesos de fabricación de disolventes.

Conservo en mi memoria afectiva las primeras impresiones que me produjo el Profesor Trigo la primera vez que sustituyó a D. Cándido en una de sus clases de Química Orgánica. Estaba todavía en vigencia el Decreto de 7 de julio de 1944, que establecía la enseñanza de esta materia en la Licenciatura de Farmacia en dos asignaturas: Química Orgánica en segundo curso y Química Orgánica Aplicada en tercero. Yo era una alumna de 19 años, que tenía una gran afición al estudio y un gran respeto por los buenos docentes, quizás por la profesión de mis padres, ambos Maestros Nacionales. Tenía D. Gregorio una apariencia física más que agradable y una necesidad de conectar personalmente con los alumnos. Mi afición por la química me había inclinado primero por la Q. Inorgánica, pero fui posteriormente atraída por el carácter creativo que intuía en la Química Orgánica. D. Gregorio me propuso en ocasiones posteriores que iniciara con él mi Tesis Doctoral, invitación que yo acepté como un gran honor cuando me licencié en 1965, sin considerar el riesgo que entrañaba para mi futuro profesional tomar esta decisión. Ante todo, porque se trataba de una dirección “a distancia”, dada su principal actividad en los laboratorios del INI, aunque yo tenía entonces cierta experiencia de laboratorio ya que había realizado estancias como alumna interna que entonces calificaba D. Cándido con el término “hacer manos”. En segundo lugar, porque no se había leído ninguna Tesis en esta Cátedra desde la del propio D. Gregorio en 1947, y la Química Orgánica de más prestigio se realizaba en las Facultades de Ciencias Químicas o en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Mi decisión fue fruto de la ilusión de D. Gregorio por crear un grupo de investigación bajo su dirección y a la mía propia. En definitiva, ¡dos ilusos en una isla desierta!

En 1968, D. Gregorio pasó a dedicarse en exclusiva a la Universidad tras obtener por oposición una plaza de Profesor Agregado. Su vocación de trabajo y su espíritu de superación le habían conducido hasta la ansiada meta, por la que abandonó una vida profesional perfectamente resuelta. Yo estaba en mi tercer año de doctorado realizando las experiencias en un cuartito del laboratorio de prácticas, por lo que viví intensamente aquella oposición. Él tenía 48 años y prisa por cambiar muchas cosas. Sólo puedo decir que desde su cargo de Profesor Agregado y posteriormente desde el de Catedrático, que ocupó por concurso de acceso en 1974 tras la jubilación del

Profesor Torres, hasta su jubilación en 1988, se abrieron las puertas de los laboratorios de investigación a un gran número de doctorandos, muchos de los cuales fueron y siguen siendo Profesores de Universidad, entre ellos cuatro catedráticos. D. Gregorio exigía el trabajo a sus colaboradores, tanto en la docencia como en el laboratorio. En el aspecto docente, reestructuró la enseñanza de la Química Orgánica en el Departamento, ya que hasta entonces se seguía un esquema estructural clásico: Serie Acíclica, Carbocíclica y Heterocíclica. Éste dio paso a una sistematización de los compuestos orgánicos por grupos funcionales, publicando en 1978 dos volúmenes de su texto "Química Orgánica". También trabajó en guías de trabajos de laboratorio que no llegaron a publicarse. En la asignatura del Plan 1965 (¡cuántos planes!) denominada "Ampliación de Química Orgánica", que se cursaba de forma optativa en cuarto curso con dos horas semanales. D. Gregorio sentó algunas de las bases que nos permitieron acometer con mayor facilidad que en otros departamentos, la enseñanza de la Química Farmacéutica, que en parte ya se había introducido como asignatura en los cursos de Doctorado¹⁸. También se organizó la enseñanza de la "Síntesis Orgánica" como asignatura optativa, con un gran énfasis en el trabajo de laboratorio. Todos los profesores que realizamos con D. Gregorio tareas docentes le teníamos un gran respeto, y su ejemplo nos hacía tomarnos muy en serio esta labor. En el reparto de la misma, la elaboración de los exámenes y las calificaciones, se respetaba el trabajo de todos y lo hacíamos de forma colegiada, sin ningún tipo de problemas serios (al menos ésta es mi impresión). Nuestro Departamento se adelantó a muchas universidades, incluyendo la nuestra, en los intentos de evaluación de la propia labor docente a través de la elaboración de encuestas a los alumnos¹⁹. Puede decirse sin reparos que D. Gregorio fue un docente ejemplar que siguió ilusionado por el estudio durante sus años como profesor Emérito, a pesar de las crecientes dificultades que le acarreaaba su enfermedad.

¹⁸ En algunos exámenes de "Ampliación de Química Orgánica" que hemos conservado pueden verse algunas preguntas que hoy corresponderían a la asignatura de Química Farmacéutica.

¹⁹ Para este tipo de tareas contábamos con el entusiasmo de algunos jóvenes Ayudantes de Clases Prácticas, especialmente de la Dra. Isabel Varela Fernández.

En el terreno de la investigación lo tuvo más difícil por los motivos arriba comentados. Su pequeño grupo partió de cero o bajo cero, si lo comparamos con otros del país que tenían medios, solera investigadora y, en ciertos casos, prestigio internacional. Con la síntesis y estudio de la actividad biológica de derivados espiránicos heterocíclicos con actividad anticonvulsiva, o de antitumorales análogos de productos naturales como la criptopleurina u otros, fuimos asomándonos a los congresos nacionales e internacionales²⁰, a realizar nuestras primeras publicaciones, y a continuar nuestra formación en el extranjero. Fruto del reconocimiento que mereció este esfuerzo fue la presidencia y organización en 1982 del Segundo Congreso Nacional de Química Terapéutica, de cuya Sociedad era entonces Presidente el Profesor Antonio Monge. A este Congreso acudieron científicos relevantes de la época, como el Profesor Shen, que desarrolló en la Merck los antiinflamatorios indometacina y sulindaco²¹, o el Profesor Ganellin, que desarrolló el antihistamínico H₂ cimetidina en SmithKline&French²².

Mi participación temprana (incluso prematura) en este grupo me impide hablar de él con objetividad. Sólo debo atenerme a los hechos ya comentados, a las tesinas de licenciatura y a las Tesis Doctorales que se defendieron, a los Proyectos de Investigación que, gracias a D. Gregorio, empezaron a subvencionar una infraestructura y unos laboratorios, a las relaciones nacionales e internacionales que se fueron estableciendo, y a la relevancia creciente de las publicaciones científicas que se realizaron. Gran parte de lo que yo considero un gran éxito se debe a la afición por la ciencia que irradiaba y que supo inculcar en sus colaboradores y alumnos, a la libertad de actuación que nos dio a todos los componentes de su grupo para realizar nuestra labor docente e investigadora, a su exigencia e impulso constantes, y a la confianza que depositó en nosotros. A D. Gregorio no se puede aplicar el terrible comentario de

²⁰ La primera publicación científica de este grupo en una revista internacional apareció en 1978, G. G. TRIGO, C. AVENDAÑO, P. BALLESTEROS and A. GONZÁLEZ: "¹H Nmr Study of the Preferred Conformations in *N*-Alkylgranatanine-3-spiro-5'-hydantoin", *J. Heterocyclic Chem.* 1978, 15, 833.

²¹ Ver, por ejemplo, Shen, T.; Winter, C. A.: "Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs", *Adv Drug Res* 12, 89-98 (1977).

²² Ver, por ejemplo, BRIMBLECOMBE, R. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, G. J.; EMMETT, J. C.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, M. E.: "Cimetidine: a non-thiourea H₂-receptor antagonist", *J. Int. Med. Res.* 1975, 3, 86-92.

Ortega y Gasset: “La ciencia y los sabios españoles son monolíticos, como sus pintores y poetas, seres de una pieza que nacen sin precursores, por generación espontánea, de las madres bravas, aunque bastante cenagosas de nuestra raza, y mueren, muerte de su cuerpo y de su obra, sin dejar discípulos”. De este tema hablará con más extensión el Profesor Álvarez-Builla.

Tras su jubilación con 65 años, se encargó de agradecer en nombre de los profesores de Farmacia jubilados ese año el homenaje que les rindió la Facultad en el que reflejó el sentimiento que les producía su prematura despedida. En su caso, fue posible su permanencia al ser nombrado Profesor Emérito en 1986, cargo que ocupó hasta 1994.

En justo reconocimiento a su labor, en diciembre de 1995 se inauguró en el laboratorio de investigación de nuestro Departamento una placa para denominarlo con su nombre.

Según un reciente artículo publicado por David A. King, Director del Consejo Científico del Gobierno del Reino Unido, comentando los datos del “Thomson Institute for Scientific Information”, la ciencia española se sitúa hoy a nivel mundial en el undécimo lugar, y la Química, en el noveno lugar. En dicho informe, se destaca la magnífica labor que los químicos españoles han realizado en las últimas décadas, sin olvidar la importantísima contribución de otros anteriores que sembraron los frutos que ahora se recogen. ¡Muchas gracias, D. Gregorio!

Quiero terminar comentando ciertas características del Profesor González Trigo al margen de su actividad profesional. Yo creo que fue ante todo un padre y un esposo totalmente entregado, que sentía adoración por sus cinco hijos y, posteriormente, por las familias que éstos formaron. Podía ser cercano a pesar de su gran timidez, aunque en general era serio. Nadie podía imaginar que, cuando se lo proponía, podía ser muy ingenioso y divertido. Por eso nos sorprendió a todos el discurso que leyó en el Hotel Mindanao de Madrid con motivo de la imposición de las insignias de la Muy Honorable Orden del *Tripholium Campestre* y de la concesión del TRIFOLIUM VETERA el 6 de julio de 1984²³. De él destaco esta frase dirigida a

²³ La revista “El monitor de la Farmacia” reflejó la noticia de este acto, en el que fueron homenajeados otras personalidades del mundo farmacéutico (entre ellas nuestro actual Presidente).

D. Guillermo Folch tras la presentación de éste: "...me has juzgado sólo por signos externos, como lo haría cualquier inspector de la renta, sin pensar que acaso tenga, aunque sólo sea de vez en cuando, algún arranque de humor..."

Tenía fundamentalmente una gran ilusión por la ciencia y, en particular, por esta Academia y por sus actividades. Fue admirable y ejemplar en su enfermedad, nunca le vi arrojando la toalla, ni en su trabajo ni en su vida privada. Cuando lo visitaba en los últimos años, sabía que el tema que más le interesaba eran las noticias científicas y personales de esta Casa, nunca se quejaba y era fácil despertar su entusiasmo con cualquier noticia relacionada con los trabajos que llevábamos a cabo. Enterado de las obras de restauración de este edificio, lo visitó por última vez a finales del año 2003, animado de una gran ilusión, entusiasmo que hizo llegar al equipo director mediante una carta²⁴.

Quiero terminar excusándome ante todos ustedes, especialmente a los que lo conocieron y acompañaron en la vida, por las muchas lagunas que sin duda habrán encontrado en esta breve necrológica. Sólo puedo justificarme expresando lo mucho que debo a D. Gregorio y la admiración que me produce su dedicación al trabajo. ¡Descanse en paz, querido Profesor!

²⁴ C. FRANCÉS: "Necrológica", *Anal. R. Acad. Nac. Farm.* 2004, 70, 793-797.

Gregorio González Trigo: Una visión en el tiempo

JULIO ÁLVAREZ-BUILLA

“(La sabiduría)... Sin engaño la aprendí, sin envidia la comunico
y a nadie escondo sus riquezas...”
Libro de la Sabiduría, 7, 13.

Excmo. Sr. Presidente, Excmo. Sres. Académicos, Sras. y Sres.:

Mi intervención en esta sesión en memoria de Don Gregorio González Trigo se va a centrar en la actividad investigadora realizada en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense, donde compartí con él doce años de trabajo.

Mi encuentro con Gregorio González Trigo se retrotrae a 1969. En este año estaba yo acabando la carrera y tomé contacto con la profesora Carmen Avendaño que, a la sazón, realizaba su Tesis Doctoral para trabajar en Química Orgánica experimental. La hoy profesora Avendaño me comunicó que Gregorio González Trigo acababa de obtener la plaza de Profesor Agregado y estaba intentando montar un equipo que se dedicase a la química orgánica de medicamentos, un campo que a mí me parecía apasionante. Me lo presentó, comencé a asistir a los laboratorios, primero como alumno interno, después, como profesor ayudante, y en poco tiempo decidí que, si podía, ese era el camino que quería para mi vida profesional.

Pero hay que hacer historia —aunque la ha glosado ya en parte la profesora Avendaño— sobre el Departamento de Química Orgáni-

ca de la Facultad de Farmacia de Madrid, y yo quisiera hacerla refiriéndome al periodo más reciente. La Cátedra de Química Orgánica aplicada a la Farmacia, que así se llamaba en los años treinta, estuvo ocupada en esa década por Antonio Madinaveitia y Tabuyo, un profesor con excelente formación científica adquirida en Zurich y Berlín como becario de la Junta de Ampliación de Estudios, junto al Profesor Richard Wilstätter (1), premio Nóbel en 1915. Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, en la guerra se exilió en México, donde creó el Instituto de Química de la UNAM. La cátedra quedó vacante al final de la guerra civil, y fue ocupada por Cándido Torres por traslado desde Barcelona.

Cándido Torres procedía de la cátedra de Química Orgánica de Farmacia de Barcelona, y se había formado en los años veinte, también merced a las becas de la Junta de Ampliación de Estudios, con Ernest Fourneau (2) del Instituto Pasteur de París. El Profesor Torres estuvo al frente de la cátedra de Madrid desde comienzos de la década de los 40 hasta 1971, en que se jubiló. En este contexto surge Gregorio González Trigo.

¿De dónde procedía Gregorio González Trigo?

El profesor González Trigo estudió en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid entre los años 1939-1944. Es pues, miembro de la primera promoción de la posguerra. Esta promoción se encuentra con la Universidad desmantelada como consecuencia de la guerra civil, que provoca, entre otros efectos perversos, una auténtica quiebra de la institución. Autores como Giral (3), Sánchez Ron (4) y López Ocón (5) entre otros, han analizado el desastre que supuso la guerra civil y sus consecuencias para el desarrollo de la ciencia y la universidad españolas. En este entorno, y con la otrora flamante Ciudad Universitaria de Madrid, destruida por haber sido frente de guerra, Gregorio González Trigo estudió en la antigua facultad, en esta casa. Y con una universidad en la que la muerte por la guerra, el exilio y la depuración afectaron —son cifras pendientes todavía de investigación detallada— al 50% de los catedráticos, Gregorio tuvo que ser autodidacta. En 1947, lee su Tesis Doctoral (6), dirigida por Cándido Torres, sobre “Contribución al estudio de los

componentes de la naranja española”. Aunque fue un notable docente, no tenía una buena experiencia como investigador, lo intentó, pero no había encontrado ni el ambiente adecuado, ni había tenido escuela, en un oficio en la que ésta es imprescindible. Por fortuna, en los años siguientes, y a la espera de mejores tiempos en la Universidad, su trabajo en los laboratorios de la empresa Calvo Sotelo, dedicado a la petroquímica, lo mantuvieron activo en lo posible.

Influencia de González Trigo en la investigación del Departamento

Sin embargo, y a pesar de las limitaciones inherentes a toda su generación, Gregorio González Trigo tuvo una influencia decisiva sobre la productividad científica del Departamento de Química Orgánica que su antecesor, el profesor Torres, había convertido en un desierto. Como puede verse, con sólo echar un vistazo al historial de producción del Departamento, que muestra las Tesis doctorales leídas

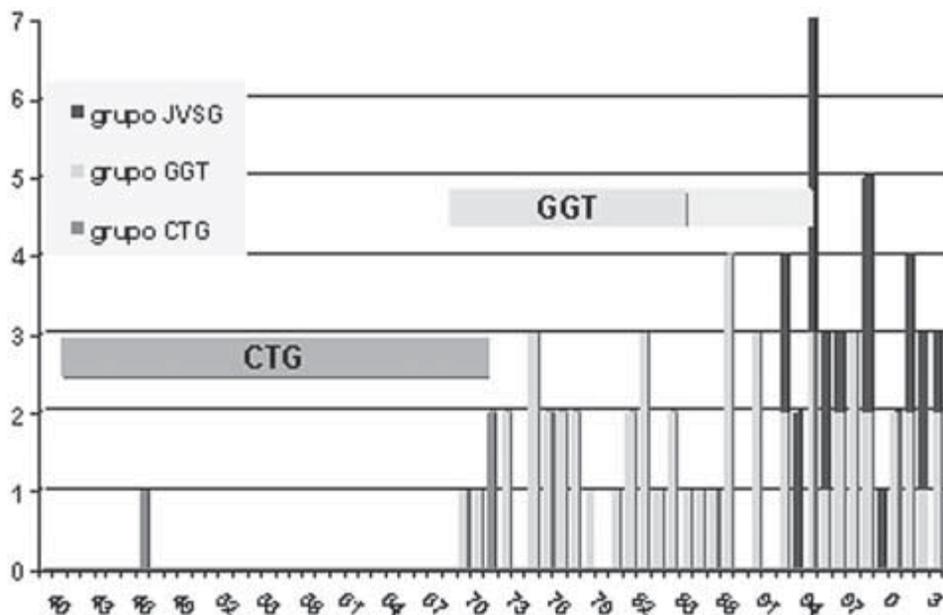


GRÁFICO 1. Producción de tesis doctorales en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, 1940-2004 (fuente: Archivo del Departamento).

das entre 1940-2004 (7), es muy elocuente ver cómo en el periodo inicial sólo se lee una tesis doctoral en 1946, la de Gregorio González Trigo, y después, la nada hasta la década de los 70.

En el gráfico se han simplificado los datos, de forma que se agrupan las Tesis en función de la procedencia del investigador principal del grupo, aunque en muchas el director haya sido uno de sus colaboradores. Adicionalmente, se marcan los periodos de influencia de los dos catedráticos CTG y GGT, desde el año de su toma de posesión —que en el caso de González Trigo es el de su toma de posesión como Profesor Agregado—. Así el grupo de GGT y su equipo, así como sus sucesores, la profesora Carmen Avendaño en particular, van a seguir produciendo tesis doctorales desde el año 70 hasta la actualidad de forma regular. A partir de la segunda mitad de la década de los ochenta, con la incorporación del profesor Sinistera, otra línea de trabajo, y otro grupo, comienza a producir, adicionalmente, tesis doctorales en el Departamento, que empiezan a leerse a partir del año noventa y que aparecen por separado, dado que se trata de un grupo totalmente independiente de los anteriores.

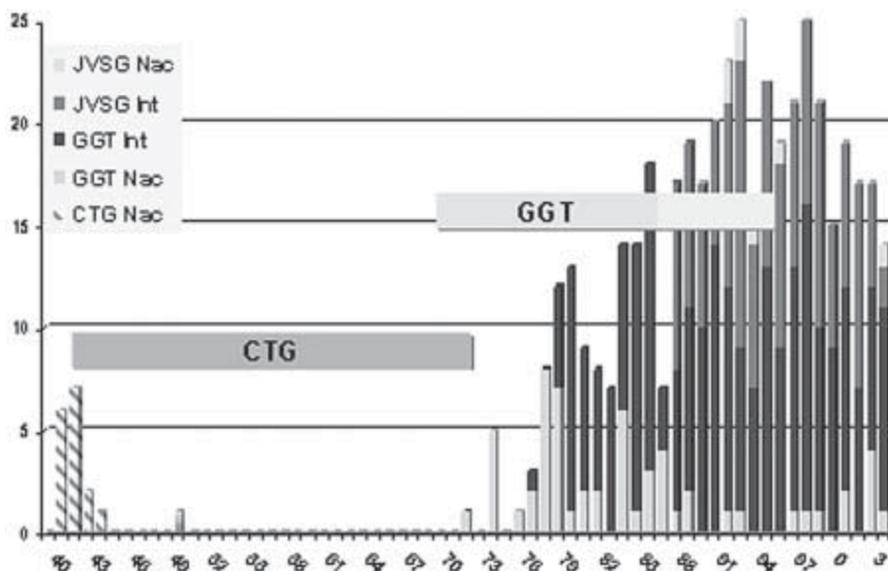


GRÁFICO 2. Producción de artículos científicos en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, 1940-2004 (fuente: Archivo del Departamento).

El gráfico 2, de manera adicional, muestra la producción en artículos científicos del Departamento (7), con una distribución similar a la del caso anterior, sólo que en este caso se divide cada área en dos series: artículos en revistas nacionales y artículos en revistas internacionales. Por otra parte, los artículos que aparecen asignados al profesor Torres en los años cuarenta, aparecen marcados de diferente manera, porque son artículos de divulgación, sin resultados propios ni parte experimental y esto nos da idea de las dificultades para investigar en aquellos años. Llama la atención este fenómeno cuando el profesor Torres, que sí tenía formación y experiencia, había mantenido hasta los años treinta una actividad científica regular. En cuanto al periodo del profesor González Trigo y su equipo, se observa en el gráfico cómo los trabajos de los primeros años setenta, en diversas revistas nacionales, pero sobre todo en *Anales de Química*, se van convirtiendo en artículos en revistas internacionales de forma mayoritaria. A partir de la segunda mitad de la década de los ochenta, el grupo del Profesor Sinisterra comienza a contribuir a las publicaciones del departamento.

Gregorio González Trigo se jubila en 1986, y mantiene un nombramiento de emérito, ya con actividad decreciente debido a su enfermedad, hasta 1994.

Experiencia personal

El profesor Gregorio González Trigo no sólo alentó mi dedicación a la química en mis pasos iniciales (8), sino que dirigió mi tesis doctoral sobre análogos de un alcaloide natural, la Criptopleurina, que inhibe la biosíntesis proteica en el paso de translocación.

Es difícil darse hoy una idea de lo que suponía trabajar en aquel laboratorio entonces. Un departamento que había estado cerrado durante 30 años, y donde todos los que estábamos sabíamos de síntesis orgánica experimental muy poco, y lo que sabíamos era antiguo. Costó mucho abrirse camino, utilizando instrumentación prestada (RMN, IR, Masas, Rayos X) y teniendo dificultades hasta para conseguir la financiación básica o los reactivos adecuados. Carmen Avendaño, Enrique Gálvez, Manuel Martínez, o yo mismo, entre otros, tuvimos que aportar cada uno lo que aprendíamos para

que se incorporase a los laboratorios, o trabajar muchas veces sin resultados aparentes, para ir dotando a los laboratorios, todavía con la misma estructura que había diseñado en su día D. Antonio Madinaveitia, con mejores instalaciones. Costó muchos años escribir los trabajos, y todos tuvimos que aprender primero publicando en revistas nacionales, y después en revistas internacionales, modestas y luego mejores, poco a poco.

Nada más acabar la Tesis Doctoral, en 1976, los doctores más jóvenes del grupo comenzamos a intentar hacer una estancia postdoctoral en algún centro internacional de prestigio. Algo que nos permitiese mejorar nuestro nivel técnico en el laboratorio. Gregorio González Trigo aceptó que marchásemos los primeros a hacer nuestras estancias correspondientes: Modesta Espada marchó a Marsella con José Elguero, a mí me aceptó Alan R. Katritzky, en la Universidad de East Anglia, y Paloma Ballesteros vino después a East Anglia y después marchó a Estados Unidos. Otros siguieron a partir de entonces este camino.

Mi llegada a East Anglia en 1978 fue una impresión inolvidable, que yo suelo representar con el modelo de que salté de un laboratorio de comienzos del siglo XX a uno de finales en pocos días. El grupo de ARK era en aquel momento uno de los más relevantes del mundo en química de compuestos heterocíclicos. Lo que aprendí con ARK y su equipo —que difícil es en ciencias experimentales hablar hoy de individualidades— ha sido, aunque otros científicos me hayan influenciado después, la base sobre la que he asentado mi labor investigadora en los años posteriores.

Después, de regreso a Madrid, busqué mi camino en la Universidad de Alcalá, donde desde el año 1981 he desempeñado mi trabajo.

Para mí, si tengo que llamar a alguien maestro, éste sería sin duda a Alan R. Katritzky; él y su equipo me enseñaron este oficio que tanto me apasiona. Pero nada de esto hubiera sido posible si Gregorio González Trigo no hubiese estado al principio del camino con su magisterio, aliento y apoyo. Este ha sido su mayor mérito, haber huido de la comodidad, al incorporarse al Departamento de Química Orgánica de Farmacia de la Universidad Complutense, y haber abierto las puertas para que otros, que veníamos detrás, reabriésemos una escuela que había desaparecido durante años.

Para terminar, y como muestra de esta actitud, déjenme citar a Max Weber, que decía a sus alumnos en la Universidad de Munich, en 1919:

“...Saquemos de aquí la conclusión de que sólo con añorar y esperar no es suficiente y hagamos otra cosa: vayamos a nuestro trabajo y estemos a la altura de las exigencias actuales, tanto humana como profesionalmente. Estas exigencias son simples y sencillas si cada uno encuentra el espíritu (Dämon) que sostiene los hilos de su vida y le obedece...” (9).

Agradecimientos

El autor tiene que agradecer a la Profesora C. Avendaño los datos de productividad del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, a los Profesores J. Puerto y B. del Castillo, el suministro de fotos sobre la antigua Facultad de Farmacia, y al Profesor L. Castedo, la imagen de E. Fourneau.

Referencias y notas

- (1) MARTIN WILLSTÄTTER, R. (1872-1949) estudió química en la Universidad de Munich y realizó su tesis doctoral bajo la dirección de Adolf Von Baeyer. En 1905 se incorporó como catedrático al Federal Technical College de Zurich. En 1912 aceptó un puesto en el Institute of Chemistry de Berlin/Dahlem, junto con una cátedra honoraria en la Universidad de Berlín. Durante este periodo de tiempo estudió con sus colaboradores la estructura de la clorofila, hizo aportaciones la de la hemoglobina y estudió la de los antocianos, colorantes de los frutos y las flores, lo que le valió en su conjunto, el Premio Nóbel de Química en 1915. Este mismo año acepta la solicitud de la Universidad de Munich, para suceder a su antiguo profesor Adolf Von Baeyer. Aquí permanece hasta el año 1924 cuando, como protesta del antisemitismo creciente, abandona la cátedra y se retira. En 1938 tiene que escapar de la Gestapo, exiliándose a Suiza, donde reside sus últimos años en Muroalto, cerca de Locarno, hasta su fallecimiento en 1949. (<http://nobelprize.org/nobel/nobel-foundation>)
- (2) FOURNEAU, E. (1872-1949), químico francés, diplomado en la Facultad de Farmacia de París en 1898. Pasó tres años en Alemania, en los laboratorios de los mejores químicos germanos, y a su vuelta a Francia en 1901, convence a los hermanos Poulenc para abrir un laboratorio de química farmacéutica

en Ivry-sur-Seine, y su primer descubrimiento fue el de la Stovaína (llamada así por la traducción al inglés del nombre de su autor) o amilocaína, un anestésico local de baja toxicidad. Este descubrimiento convenció en su día al Doctor Roux, Director del Instituto Pasteur, para encargarle la organización de un laboratorio de quimioterapia, del que Fourneau se convierte en director a partir de 1911. A partir de entonces, este laboratorio se va a convertir en un centro de referencia, con alumnos de todo el mundo venidos a investigar al lado de Fourneau y su equipo. Desde aquí, Fourneau pone a punto nuevos productos de forma regular, en 1921 descubre, con Levaditi, los Tréfouël y Navarro-Martin, el 190 F o stovarsol, activo contra la sífilis; el 290 F, u orsanina, contra la enfermedad del sueño; el 309 F, o moranyl, activo frente a ciertas tripanosomiasis; la rhodoquina, antipalúdico de síntesis; con los Tréfouël y Nitti, descubre la actividad de las sulfonas frente a la lepra; con Bovet muestra la propiedades de los primeros antihistamínicos de síntesis, de los simpatolíticos y de algunos curarizantes. Con los Tréfouël, Bovet y Nitti, Fourneau, retoma en 1935 los trabajos de Domagk sobre la acción del prontosil, y contribuye decisivamente a la elucidación de la sulfanilamida como metabolito activo del producto, permitiendo con ello el avance definitivo de la sulfamidoterapia. (<http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/bibliogr/fourneau.html#7>)

- (3) GIRAL, F. (1994): "La ciencia española en el exilio. El exilio de los científicos españoles (1939-1989)". Barcelona, Anthropos.
- (4) SÁNCHEZ RON, J. M. (1999): "Cinzel, martillo y piedra: historia de la ciencia en España (siglos XIX y XX)". Taurus Ediciones. Madrid.
- (5) LÓPEZ-OCÓN CABRERA, L. (2003): "Breve historia de la ciencia española" Alianza Editorial. Madrid.
- (6) GONZÁLEZ TRIGO, G. (1947): "Contribución al estudio de los componentes de la naranja española". Universidad Complutense.
- (7) Datos del archivo del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
- (8) Mi entrada en el Laboratorio de Química Orgánica, dado que yo era un hombre conocido por haber sido delegado "rebelde" en los años sesenta, le costó a Gregorio algún disgusto con alguno de sus colegas. Nunca me preguntó lo que pensaba, sino si me interesaba la química.
- (9) WEBER, M. (1909): "La ciencia como profesión", pág. 89. Espasa Calpe (1992). Cita de "Die lehrfreiheit der Universitäten".

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2004

EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

La Real Academia Nacional de Farmacia inició oficialmente las actividades correspondientes al Curso Académico 2004 con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural, presidida por el Excmo. Sr. Presidente de la Corporación, D. Juan Manuel Reol Tejada, que tuvo lugar el día 22 de enero y contando con la presencia en la Mesa con las Excmas. Autoridades siguientes: a su derecha D. Salustiano del Campo Urbano, Presidente del Instituto de España; D. José Manuel Romay Becarria, Presidente del Consejo de Estado; D. Manuel Ruiz Amil, Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia; y a su izquierda con los Excmos. Sres. D. Julio Iglesias Ussel, Secretario de Estado de Educación y Universidades; D. Juan Jiménez Collado, Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina; y Dña. M^a Carmen Francés Causapé, Secretaria de la Real Academia Nacional de Farmacia. Y contando además en el estrado con la asistencia de los Excmos. Sres. Académicos de esta Corporación.

El Dr. Reol primeramente pronuncia unas palabras de salutación para dar la bienvenida a las Autoridades, Académicos y asistentes al acto y en particular a los Muy Ilustres Sres. Académicos de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia de Cataluña presentes que tomaron en esta sesión posesión como Académicos Correspondientes de la Real Academia Nacional de Farmacia, a saber: D. José Esteve Soler, Presidente de aquella Corporación; D. Francisco Taxonera Roca, Vicepresidente, y D. Miguel Ylla-Catalá Genís, Secretario. A continuación, hizo la loa de aquellas Muy Ilustres personalidades incluyendo al Muy Ilustre Sr. D. José María Suñé Abrussá, Académico de Número de aquella Corporación, Expresidente; que no pudo asistir personalmente pero al que igualmente se incorporó como Académico Correspondiente en esta Sesión; y la de D. Ricardo García Gil a quien se le había concedido la Medalla Carracido en su categoría de Bronce.

Seguidamente, el Dr. Reol concedió la palabra a la que suscribe quien procedió a dar lectura a la **Memoria de Secretaría** comprensiva de la labor académica efectuada en el año 2004. A continuación, el Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez dio lectura al **Discurso Reglamentario** titulado: "La conservación del suelo, base de su sostenibilidad y soporte de la Salud", dedicado a la memoria del Prof. Ángel Vián Ortuño. En primer lugar, el Dr. Jiménez Gómez justifica el interés del tema porque el Suelo es esencial para mantener y promocionar la salud de los seres vivos, y de manera muy singular la de la humanidad porque en él tienen lugar un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos de cuyo equilibrio depende aquélla. El Dr. Jiménez aborda el tema de su discurso en diez apartados. En el primero trata del suelo y sus usos y define tres tipos de suelos: pasivos, productivos o agrarios e improductivos. En el apartado segundo se ocupa del Suelo pasivo y sus problemas, suelo que está creciendo lenta pero continuamente y que se produce a costa del suelo agrícola. En el apartado tercero se refiere al Suelo productivo: su composición y estructura, que es el de mayor extensión y en el que se integran el agrícola, el ganadero y el forestal. El apartado cuarto lo dedica el Dr. Jiménez a la Funcionalidad del Suelo agrícola, que si en un principio se limitaba a la agricultura, ganadería, selvicultura y, eventualmente, a la caza; hoy se ha ampliado considerablemente porque realiza también otra serie de funciones básicas de carácter económico, ambiental, social y cultural. Especifica el Dr. Jiménez que dentro de las nuevas perspectivas introducidas por el desarrollo sostenible se le reconoce al Suelo la importante función de ser reserva de la biodiversidad biológica.

El apartado quinto del discurso lo dedica el Dr. Jiménez a la Erosión natural del Suelo que ha sido la causa de que en los últimos diez años se haya perdido más de un 15% de la superficie total cultivable del planeta; mientras que en el sexto se ocupa de la contribución del Antropoceno a la degradación del Suelo, es decir, la colaboración indolente de la especie humana mediante prácticas como son las malas prácticas agrarias o la agricultura intensiva. En el apartado séptimo, que es el más amplio, describe los impactos de la agricultura en la conservación de la funcionalidad del Suelo y los recursos buscados por el hombre para evitar daños, no solo para el Suelo, sino también para evitar las repercusiones que puedan tener

para la Salud humana. En su discurso el Dr. Jiménez va desgranando la inquietud del hombre en la búsqueda de nuevos suelos, en la conservación de la materia orgánica, en el impacto de la agricultura intensiva sobre el suelo que conlleva una serie de riesgos añadidos por el uso de fertilizantes, la salinización y los productos fitosanitarios. En el apartado octavo, dedicado a Suelos contaminados y contaminantes, hace referencia a las agresiones que sufre el Suelo debido a las actividades urbanas, domésticas, comerciales, industriales o mineras. El apartado noveno define los sistemas físico-químicos de descontaminación de Suelos y el décimo lo dedica a la biorremediación y fitorremediación.

El Dr. Jiménez finaliza su discurso con un epílogo deseando dar un mensaje de optimismo, ya que el progreso científico permite proteger al Suelo de la erosión y las escorrentías, la práctica de la agricultura ecológica, o la transgénica pues “Hoy tenemos a nuestra disposición, y económicamente asequibles, una cantidad de energía y un conjunto de medios y de conocimientos con los que difícilmente se podía soñar hace 60 ó 70 años”.

El acto revistió una especial relevancia puesto que el Excmo. Sr. Presidente procedió a la entrega de la Medalla Carracido, en su categoría de Bronce, al farmacéutico y sanitario: D. Ricardo García Gil. Además y, por primera vez en el transcurso de la Sesión Inaugural, el Sr. Presidente hizo entrega de los símbolos que acreditan la condición de Académico Correspondiente a cuatro extraordinarias figuras de la ciencia farmacéutica y del mundo del medicamento, Académicos de Número de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y Presidente, Expresidente, Vicepresidente y Secretario respectivamente de la misma: los Muy Ilustres Dres. D. José Esteve Soler, D. José María Suñé Arbussá, D. Francisco Taxonera Roca y D. Miguel Ylla-Catalá Genís, este último recogió la medalla y el diploma en nombre del Dr. Suñé que no pudo estar presente en el acto y el Dr. Esteve pronunció unas palabras de agradecimiento en nombre de los beneficiarios.

Por último, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2003.

* * *

Durante el año pasado ha tenido lugar la **Incorporación de Nuevos Miembros a nuestra Corporación**. Como **Académico de Número** tomó posesión el Académico Electo Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego, quien el día 8 de enero leyó su discurso titulado: “Hitos en la génesis y evolución del concepto de proteína: de las albúminas a las proteínas sin plegamiento”, no sin antes realizar el panegírico del Excmo. Sr. D. Manuel Martel San Gil destacando su labor docente, científica e industrial y académica que hoy pervive gracias a la generosa donación de una bella colección de minerales para el Museo de la Corporación.

El Dr. Giménez Gallego aborda en su discurso cómo las proteínas captaron el interés de la Química moderna, su identificación que supuso una revolución conceptual consagrando el nombre de proteínas y su clasificación como verdaderas macromoléculas; su estructura química con expresión de la función del enlace peptídico, composición en aminoácidos y determinación de ésta mediante cromatografía; la secuencia de aminoácidos de las proteínas, el estado plegado de las proteínas en su estado nativo y el papel que juegan en él los puentes hidrógeno así como el efecto hidrofóbico; la estructura tridimensional de las proteínas y su determinación por cristalografía, así como los factores responsables de que adquieran una estructura plegada específica y cómo mediante la espectroscopia magnética nuclear es posible determinar su estructura tridimensional y estudiar la dinámica de esta estructura. La gran parte del discurso del Dr. Giménez Gallego está dedicada a la estructura homogénea regular y compacta de las proteínas, pero al final del mismo se ocupa de las proteínas nativas desordenadas delineando así, según sus palabras, “La historia de cómo se ha ido entendiendo qué eran las proteínas desde que se creó el término hasta el momento actual”. Fue contestado, en nombre de la Corporación, por el Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso quien hizo referencia a la trayectoria personal y a la carrera científica del beneficiario haciendo hincapié en los campos científicos que éste ha cultivado y en particular a las aplicaciones biomédicas de sus investigaciones, destacó el Dr. Portolés que el Dr. Giménez Gallego ha demostrado con su discurso tanto su erudición científica como literaria exponiendo “detalladamente la peripecia vital de las proteínas, desde la remota Alquimia hasta la Química Experimental de

nuestra época, resaltando su importante papel regulador para nuestra humana existencia”.

Como **Académicos Correspondientes** se produjeron catorce incorporaciones, once de ellas de españoles y tres de personas naturales de países con los que nuestra Academia mantiene relación científica. Así, el 22 de enero tomaron posesión los ya mencionados Académicos de la Real Academia de Farmacia de Cataluña los Muy Ilustres Dres. José Esteve Soler, José María Suñé Arbussá, Francisco Taxonera Roca y Miguel Ylla-Catalá Genís, de Barcelona; el 5 de febrero el Dr. Peep Veski, Profesor de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia de la Universidad de Tartu (Estonia), leyó su discurso “Cronopharmaceutical drug delivery” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García; el 19 de febrero el Dr. Ernesto Castañeda Martín, Catedrático de Universidad en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación de la Universidad Politécnica de Madrid, leyó su discurso “Biomateriales de naturaleza inorgánica: Metales, aleaciones y cerámicas” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez; el 18 de marzo la Dra. Consuelo Boticario Boticario, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, leyó su discurso “¿Una alimentación sana previene el cáncer?” y fue presentada por el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza; el 15 de abril el Dr. Antonio Rodríguez Artalejo, Catedrático de Farmacología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, leyó su discurso “La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal” y fue presentado por la Excmo. Sra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal; el 20 de mayo el Dr. Manfred Anke, Profesor de Toxicología de la Nutrición en la Universidad de Jena (Alemania), leyó su discurso “Essentiality of arsenic, bromine, fluorine and titanium for animal and man” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas; el 17 de junio el Dr. Agustín García Asuero, Catedrático del Departamento de Química Analítica en la Universidad de Sevilla, leyó su discurso “Calibración, comparación de métodos y estimación de parámetros en el análisis químico y farmacéutico” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García; el 7 de octubre el Dr. José Carlos Menéndez Ramos, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Far-

macia de la Universidad Complutense de Madrid, leyó su discurso “Nuevos antitumorales de origen marino” y fue presentado por la Excm. Sra. Dña. María del Carmen Avendaño López; el 4 de noviembre la Dra. Flora de Pablo Dávila, Profesora de Investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Madrid, leyó su discurso “La insulina y su precursora la proinsulina en el desarrollo embrionario” y fue presentada por la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto; el 18 de noviembre del Dr. Ángel Reglero Chillón, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de León leyó su discurso “Ácidos Siálicos, distribución, significado biológico y evolución” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo; y por último, el 2 de diciembre el Dr. Geoffrey Burnstock, Director del “Autonomic Neuroscience Institute” del Royal Free and University College Medical School (Londres), leyó su discurso “The Field of Purinergic Signalling” y fue presentado por la Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal.

* * *

Hemos de hacer mención especial a la pérdida sufrida este año por la Corporación debida al fallecimiento de cinco Académicos de Número, los Excmos. Sres. D. Pablo Sanz Pedrero, D. Gregorio González Trigo, D. León Villanúa Fungairiño, Presidente de la Comisión de Aguas Minerales y Minero-medicinales; D. Domingo Espinós Pérez y D. Segundo Jiménez Gómez, Académico Tesorero; y del Académico Correspondiente en Madrid el Dr. Jorge Fernández López Sáez. Asimismo han fallecido D. Antonio de Fuente Castells y D. Ricardo García Gil quienes ostentaban la Medalla Carracido de Bronce. Junto al sentimiento del vacío que han dejado entre nosotros, vaya para todos ellos nuestro afectuoso recuerdo y el deseo de que se encuentren en la Paz del Señor.

* * *

Durante el Curso Académico 2004 nuestra Corporación ha mantenido sus actividades tradicionales. En **Sesiones privadas** se celebraron diez Juntas de Gobierno, diez Juntas Generales, y de las

restantes Comisiones Permanentes dos de Gobierno Interior, tres de Hacienda, tres de Admisiones, tres de la Medalla Carracido, dos de Publicaciones y tres de Informática y Comunicación. Asimismo, las Secciones celebraron las siguientes reuniones: tres la de Química y Física, tres la de Biología, Biotecnología y Farmacogenómica, dos la de Farmacología y Farmacoterapia, cinco la de Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente y cuatro la de Historia, Legislación y Bioética.

* * *

Respecto a las Actividades desarrolladas durante el Curso 2004, la Corporación ha celebrado una **Sesión Necrológica** el día 12 de febrero dedicada a la Memoria del Excmo. Sr. D. Manuel Gómez-Serranillos Fernández, en la que intervinieron el Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno y los Ilmos. Sres. D. José María Calleja Suárez y D. Luís San Román del Barrio, así como el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

Asimismo como es tradicional, se han llevado a cabo **Sesiones Científicas** una vez por semana, concretamente en jueves, aunque en ocasiones se han efectuado varias sesiones en una misma semana e incluso en el mismo día.

Los frutos de la actividad llevada a cabo han sido las cuarenta Sesiones celebradas, entre ellas mencionaremos seis **Sesiones Extraordinarias**: la celebrada el día 31 de marzo que tuvo el carácter de Sesión Monográfica conjunta de las Reales Academias Nacionales de Farmacia y Medicina y el Instituto de Salud Carlos III, que se celebró en la sede de la Real Academia Nacional de Medicina, sobre el tema “Síndrome Agudo Respiratorio Severo y Gripe Aviar” en la que intervinieron como ponentes el Ilmo. Sr. D. José María Eirós Bouza y los Excmos. Sres. D. Juan del Rey Calero y D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, que disertaron respectivamente sobre “Infecciones víricas emergentes: SARS y gripe aviar”, “Aspectos epidemiológicos del SARS y de la influenza aviar” y “Virus de la gripe: Algunos aspectos enzimáticos. Nuevos agentes antigripales”.

La del día 20 de abril que tuvo por objeto la presentación de la Monografía n.º XIV “Citocromo P-450”, publicada por la Corporación

contando con el patrocinio del Instituto de España, en la que intervinieron el Excmo. Sr. D. Pedro García Barreno, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; la Ilma. Sra. Dña. M.^a José Gómez-Lechón Moliner, Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Académica de Número, Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto.

La del día 29 de abril tuvo como fin presentar la nueva Página web de la Corporación por parte del Excmo. Sr. D. Antonio Luís Doadrio Villarejo, Académico de Número.

La del día 5 de octubre se celebró con motivo de la Presentación del libro titulado “Plantas Medicinales y su vinculación con la farmacia a través de los siglos” publicado en colaboración con el Museo Aboca (Italia) y patrocinado por dicho Museo, y el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid. Durante la Sesión Científica intervinieron como Ponentes: Comm. Valentino Mercati, Presidente de Aboca S.p.a., la Ilma. Sra. Dña. M.^a Jesús Mancho Duque, Catedrática de Lengua Española en la Facultad de Filología de la Universidad de Salamanca, el Ilmo. Sr. D. Francisco Cortes Gabaudan, Profesor Titular de Lengua Griega y Director del Departamento de Filología Clásica en esa misma Facultad; el Ilmo. Sr. D. Leonardo Colapinto, Académico Correspondiente y Profesor de Historia de la Farmacia en la Facultad de Farmacia de la Universidad “La Sapienza” (Roma) y la Excma. Sra. Dña. M.^a Carmen Francés Causapé, Académica de Número, que disertaron respectivamente sobre “Contenido y finalidades del proyecto del Museo Aboca: Plantas Medicinales a través de los Siglos”, “Rasgos lingüísticos de las traducciones botánicas del siglo XVI: El caso de Jarava”, “Los nombres de las plantas de Dioscórides a Jarava”, “La hierva “ahuyenta diablos” desde Plinio el Viejo a hoy” y “El Hinojo en la Terapéutica”.

La del día 16 de noviembre constituyó la I Sesión Científica Interacadémica celebrada junto con la Real Academia Nacional de Medicina en la sede de esta Corporación y versó sobre “Neurociencias” y en ella intervinieron la Excma. Sra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Académica de Número de nuestra Corporación, con la conferencia titulada “Los nucleótidos como co-transmisores” y el Excmo. Sr. D. Fernando Reinoso Suárez, Académico de Número de

la Real Academia Nacional de Medicina, con la conferencia titulada "Biografía de una neurona".

Y por último, la del día 25 de noviembre, coordinada por el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, quien disertó sobre "La importancia de los olores y el beso de la muerte" y en la que intervinieron como conferenciantes las Académicas de Número Excmas. Sras. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal y Dña. María Cascales Angosto quienes disertaron respectivamente sobre "Receptores olfativos: El perfume del éxito" y "Vía de la Ubiquitina-Proteosoma".

También han tenido lugar por vez primera tres **Tertulias Científicas**: la celebrada el día 3 de junio para tratar del "Brote de Trichinellosis" en la que intervinieron los Académicos de Número Excmos. Sres. D. Manuel Domínguez Carmona, D. Bernabé Sanz Pérez y D. Antonio Martínez Fernández; la que tuvo lugar el día 14 de octubre sobre el tema: "Controversias sobre la selección de embriones con fines terapéuticos" en la que intervino como ponente el Académico de Número Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero; y la del día 18 de noviembre que se ocupó de "La gripe española de 1918 y su conexión con la gripe aviar. Avances actuales", moderada por el Académico de Número Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, y en la que actuó como ponente el Académico de Número Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo.

Por otra parte, ha tenido lugar en nuestra sede una **Exposición**, en colaboración con el Museo Aboca de Sansepolcro (Italia) sobre "Las Plantas Medicinales a través de los herbarios y objetos de Farmacia desde el 1500 hasta el 1800" que se ha mantenido abierta al público los días 5, 6 y 7 de octubre y que ha contado con más de 2.000 visitantes.

A estas actividades hay que sumar dos **Mesas Redondas** realizadas con el patrocinio de la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación Caja Madrid: la primera el día 29 de enero, sobre el tema "Nuevas Oportunidades y Tecnologías en el Descubrimiento de Fármacos y Medicamentos", que fue presentada por el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega, Académico de Número, y contó como Ponentes con los Dres. D. Juan Antonio Hueso, Gerente del Centro de Investigación Glaxo Smith Kline; D. Willy Baeyens, Académico Correspondiente y Dña.

María Vallet Regí, Catedrática de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, quienes trataron respectivamente de “Quimioinformática en el Descubrimiento de Fármacos”, “Miniaturización y Nanotecnología Farmacéutica” e “Imitando a la Naturaleza: Nanoapatitas”.

La segunda tuvo lugar el 28 de octubre sobre “Investigación y Desarrollo de Nuevos Medicamentos para Enfermedades de Países en vías de desarrollo”, estuvo coordinada por el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega, Académico de Número, en la que intervino el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de esta Corporación, que tuvo a su cargo la presentación y en la que intervinieron como Ponentes los Dres. Dña. Nora Uranga Celaya, de Médicos sin Fronteras y Coordinadora de la Campaña de Acceso a Medicamentos Esenciales; D. Joaquín Camprubí García, Encargado de las Relaciones Institucionales de Merck Sharp & Dhome de España, S. A.; D. José F. García Bustos, del Centro de Investigación de Glaxo Smith Kline; y el propio Coordinador, quienes se ocuparon respectivamente de “I+D de Nuevos Medicamentos: situación internacional e importancia”, “Compañías farmacéuticas investigadoras y países en vías de desarrollo”, “Enfermedades de Países en Desarrollo (Diseases in Developing World D. D. W.)” y “Europa. La Cooperación a la I+D de Medicamentos y Países en vías de desarrollo”.

Además se celebraron otras actividades entre las que hay que destacar la Conferencia del Profesor Enrique Alcaraz Varó, Catedrático de Universidad del Departamento de Filología inglesa de la Universidad de Alicante en la que expuso cómo se va a proceder para la publicación, por parte de nuestra Corporación y en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, del “Diccionario Terminológico Bilingüe de Ciencias Farmacéuticas”.

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

* * *

Se ha impartido en la Corporación un **Curso del Tercer Ciclo**, patrocinado por el Ministerio de Educación y Ciencia y coordinado por el Instituto de España, sobre “Bases Moleculares del estrés oxidativo” y desarrollado por los Excmos. Sres. D. Ángel Santos Ruiz, D.^a María Cascales Angosto y D. Bartolomé Ribas Ozonas.

* * *

Entre otras **Actividades Científicas efectuadas por nuestros Académicos en otros foros** hay que destacar las realizadas en colaboración con el Instituto de España, que tuvieron lugar en la sede de dicha Institución, así nuestros Académicos han colaborado en cuatro Cursos que se han impartido sobre los Temas: “Misión de las Reales Academias” que se ha desarrollado del 16 al 24 de marzo y que ha contado el día 23 con la participación del Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de nuestra Corporación; “Contaminación y Energía” que ha sido impartido del 19 al 23 de abril por el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo; “Anticipaciones Académicas (II^a)” que se ha celebrado del 13 de octubre al 2 de diciembre en el que los Excmos. Sres. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y D. Ángel María Villar del Fresno se ocuparon respectivamente en 1 y 2 de diciembre de los temas: “Farmacogenética y farmacogenómica: Hacia una terapia individualizada” y “El reino vegetal en la farmacología”. Coordinado por los Excmos. Sres. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número, y D. Pedro García Barreno, tuvo lugar el Curso titulado “Bioquímica y Fisiopatología del Sistema Inmune” del 13 al 17 de diciembre, ocupándose el día 17 de diciembre la primera de “NADPH oxidasa fagocítica”.

El Ilmo. Sr. D. Federico López Mateos, Académico Correspondiente, ha participado en el Curso sobre “Tecnologías para el tratamiento de Residuos Industriales”, organizado por el Colegio Libre de Eméritos, el día 12 de febrero con el tema “Estrategia para el saneamiento de instalaciones industriales”; la Excma. Sra. Dña. Ana M^a Pascual-Leone Pascual, Académica de Número, ha intervenido como coordinadora, junto con el Dr. Guillermo Sáez Tormo, del Curso sobre “Balance energético y Control Neuroendocrino: Nutrición y sus repercusiones patológicas”, que ha tenido lugar en Valencia del

17 al 18 de febrero, con el patrocinio de la Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, ocupándose además de la conferencia titulada: "Control neuroendocrino del balance energético: concepto unitario de interconexión celular" y en cuyo acto inaugural en la presidencia, y dando la bienvenida a los participantes, se encontraba el Ilmo. Sr. D. Santiago Grisolia, Secretario de aquella Fundación y Académico Correspondiente. El Excmo. Sr. D. Alberto Giráldez Dávila intervino el día 19 de marzo moderando la Jornada dedicada al tema "Animal e Investigación: qué, cómo y por qué" en el Ciclo de Encuentros Interprofesionales integrado en el Forum Cultural Barcelona 2004.

El Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez ha codirigido uno de los Cursos de Verano celebrados por la Universidad Complutense en El Escorial sobre "Los retos de la Investigación biomédica en el Sistema Nacional de Salud" que ha tenido lugar del 5 al 7 de julio y en el que además se ocupó el día 5 de julio del tema "Investigación transnacional ¿una utopía?". Asimismo participó en la 11.^a edición del "Master Universitario en Atención Farmacéutica" organizado por el Centro de Formación Continua en la Universidad de Granada durante los meses de abril a julio.

Los Excmos. Sres. Académicos D. Juan Ramón Lacadena Calero, D. Francisco González de Posada, D. Manuel Domínguez Carmona, D. Segundo Jiménez Gómez, D. Bernabé Sanz Pérez y D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé han participado en los IX Cursos Universitarios de Verano que han tenido lugar en Lanzarote, organizados por el Centro Científico-cultural Blas Cabrera, ocupándose respectivamente de los temas: "Genética y Bioética", "Realidad e Inteligencia: En torno a Zubiri", "Cuestiones actuales sobre medio ambiente y salud", "Nuevos Alimentos y Medicamentos".

También algunos Académicos han participado en reuniones científicas, así el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza intervino en el IV Foro Social Mundial que se celebró en el mes de enero en Bombay (India) bajo el lema "Otro Mundo es Posible".

El Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva ha presentado el Simposio Hispano-Belga sobre "Perspectivas y Aplicaciones de la Biotecnología en el marco de la Unión Europea", organizado por la Fundación Ramón Areces los días 2 a 3 de febrero, y en el que ha intervenido en la Mesa Redonda, que tuvo lugar el día 3 sobre "Microbiología y

salud humana y animal”, la Ilma. Sra. Dña. Regina Revilla con la ponencia “Biotecnología en una empresa farmacéutica”.

El Excmo. Sr. D. Eduardo Rodríguez Rovira ha organizado el 5 de febrero en el Salón de Actos del IMSERSO la Jornada sobre “Discriminación por edad en el empleo y mayores. La Directiva 2000/78”.

El Excmo. Sr. D. Francisco González Posada, ha dirigido el II Ciclo Científico-Cultural de Conferencias sobre “Historia de la Medicina y Humanismo Médico”, organizado por la Asociación Española de Médicos Escritores y Artistas en el Centro Cultural de la Villa que se ha desarrollado del 14 de enero al 16 de marzo y en el que ha participado la Ilma. Sra. Dña. Josefina San Martín Bacaicoa con el tema “De las curas balnearias de nuestros abuelos a las actuales”.

La Excma. Sra. Dña. Ana M.^a Pascual-Leone Pascual ha participado en el Simposio Internacional sobre “Bioquímica Perinatal” que se ha desarrollado bajo el patrocinio de la Fundación Ramón Areces del 1 al 5 de marzo en el que se ha tratado de “Aspectos neuroendocrinos y energéticos” con su ponencia acerca del “Balance energético y control neuroendocrino: su importancia en el desarrollo”.

El Ilmo. Sr. D. Antonio J. Ramírez Ortega impartió el 11 de marzo en la Casa Regional Mesa de Burgos en Madrid la conferencia titulada: “Aguas mineromedicinales”.

El Excmo. Sr. D. Francisco González Posada intervino el 12 de junio en el Acto de Entrega del Monumento de Leonardo Torres Quevedo por parte de los Amigos de la Cultura Científica al Museo de Aeronáutica y Astronáutica del Ejército del Aire.

El Ilmo. Sr. D. Manfred Anke, ha formado parte del Comité Científico de la 22 Reunión Científica, organizada por la Universidad Friedrich Schiller de Jena, del 24 al 25 de septiembre que ha tratado específicamente de “Essentially and Toxicity of Macro, Trace and Ultratrace Elements”.

El Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva, ha presentado la Jornada sobre la Ciencia en la Agencia Europea del Espacio que se ha celebrado en el Salón de Actos de la Fundación Ramón Areces el día 28 de octubre en colaboración con la Agencia Europea del Espacio y el Planetario de Madrid para tratar de “Visiones Cósmicas”.

El Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas ha participado en las "IV Jornadas Cívico-Militares sobre elementos traza y toxicología de metales", organizadas los días 4 y 5 de noviembre por el Instituto de Medicina Preventiva de la Defensa y concretamente en la Cuarta Mesa sobre "Elementos traza y toxicología", que tuvo lugar el día 5 con la ponencia: "Implicaciones Toxicológicas de las Metalotioneinas".

En el XXIV Symposium celebrado por AEFI entre el 18 y el 19 de noviembre han participado como Evaluadores el Excmo. Sr. D. Alberto Giráldez Dávila, el Muy Ilustre. Sr. D. Francisco Taxonera Roca y el Ilmo. Sr. D. José Luis Lastres García. Además el Ilmo. Sr. D. Juan López-Belmonte Belmonte intervino el día 18 en la Mesa Redonda Plenaria I con la ponencia "La Unión Europea de los 25" y el Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé en la Mesa Coloquio 1 con la ponencia sobre "Gases medicinales. Nuevos medicamentos".

Finalmente el 2 de diciembre, la Ilma. Sra. Dña. Flora de Pablo Dávila ha intervenido en la Residencia de Estudiantes en el Ciclo sobre "Salud de la mujer. Nuevas perspectivas a viejos problemas" sobre el tema "Menopausia: ¿Enfermedad o situación fisiológica?".

Algunos de nuestros Académicos han participado en las actividades llevadas a cabo en Corporaciones como la Real Academia Nacional de Medicina, así el día 20 de enero el Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada pronunció la conferencia titulada "El principio de los primeros Principios: el Principio Antrópico"; El día 3 de febrero el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona disertó sobre "El acoso sexual"; El día 26 de octubre el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana abordó el tema "Armonía en el proceso oncógeno basada en la evidencia de la función citoarje: microoncozoos y resultados 1944-2004" y el 2 de noviembre el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza trató de "Ciencia y desarrollo económico".

En la Real Academia de Medicina de Cantabria en el mes de diciembre, el Excmo. Sr. D. Eduardo Rodríguez Rovira pronunció la conferencia "Salud y personas mayores. La discriminación sanitaria del mayor".

En la Real Academia de Ciencias Veterinarias, el día 4 de febrero, el Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández dio lectura a la conferencia titulada: "Ensayos de protección (vacunas) frente a *Fasciola hepatica*".

Por último, la participación de nuestros Académicos en la Real Academia de Doctores de España se ha dejado sentir en diversos actos, así la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto ha pronunciado el 11 de febrero la conferencia “Estallido respiratorio de los fagocitos” y ha contestado en 17 de noviembre al discurso de toma de posesión como Académico del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Menéndez. El 10 de marzo el Ilmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro impartió la conferencia titulada: “Médicos y Boticarios en la obra del genio barroco” y el 31 de ese mismo mes el Excmo. Sr. D. Amando Garrido Pertierra contestó al discurso de toma de posesión de la Excma. Sra. Dña. Mónica de la Fuente Rey.

* * *

Las relaciones con la **Real Academia de Farmacia de Cataluña** han continuado intensificándose durante el Curso 2004 como lo demuestra el hecho de que en las Sesiones Inaugurales de aquella Corporación y de la nuestra hubo representación oficial, habiendo sido nombrado el 20 de diciembre el Muy Ilustre Dr. D. Miquel Ylla-Catalá i Genís Presidente de aquella Corporación, quien en 19 de enero había pronunciado el discurso inaugural de esa Academia titulado “Suplendum est per artem in quo natura defuerit”.

* * *

El 4 de octubre fue presentado el libro “El Museo Cusí de Farmacia” en un acto a cargo del Muy Ilustre D. José Esteve.

* * *

La **Academia de Farmacia de Galicia** ha sido creada por Decreto 156/2004 del Diario Oficial de Galicia de 19 de julio de 2004, página 10255-10260 y en el año 2004 se han incorporado tres nuevos Académicos de Número entre los que se encuentra el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, quien tomó posesión el día 22 de noviembre con el discurso titulado “Complejos de inclusión con ciclodextrinas: perspectivas actuales y retos de futuro”.

* * *

La Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia celebró su sesión inaugural el 22 de enero estando el discurso a cargo del Ilmo. Sr. D. Joaquín Jordán Pérez, miembro Constituyente de esta Corporación, que versó sobre “Farmacia: Ayer, hoy y mañana”. En este curso académico varios Académicos de Número y Correspondientes han ingresado en la Corporación.

* * *

Algunos de los miembros de nuestra Corporación han sido galardonados con diversas **Distinciones** o han sido designados para ocupar puestos de responsabilidad en algunos organismos según ha llegado a nuestro conocimiento, entre ellos mencionaremos por su relieve que al Excmo. Sr. D. Eduardo Primo Yúfera le ha sido concedida la Medalla al Mérito en el Trabajo, en su categoría de Oro por Real Decreto 94/2004, de 19 de enero. El Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza recibió el 31 de enero en el Ayuntamiento de Salamanca el Premio al Español del Año 2003 concedido por el Instituto Cultural Alfonso X el Sabio; en 27 de septiembre ha recibido la Medalla de la Universidad Autónoma de Madrid en un acto organizado por esa Universidad y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y ha sido renovado en el cargo de Presidente de la Fundación OTIME (Oficina Técnica Internacional del Medicamento).

El Excmo. Sr. D. José Esteve ha sido galardonado con el Premio Extraordinario a la Trayectoria Profesional en el Sector Farmacéutico, patrocinado por el Grupo Expansis.

El Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva ha recibido el nombramiento de Consejero Superior de Medicina de la Comunidad Autónoma de Madrid el 4 de marzo y el día 21 de abril se le nombró Académico de Honor de la Real Academia Sevillana de Ciencias.

El Muy Ilustre Sr. D. Jordi Bolos Capdevila ingresó como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia de Cataluña el día 19 de abril y pronunció su discurso de ingreso sobre “Ciencia i professió farmacêutiques”.

El Excmo. Sr. D. José Miñones Trillo ha sido elegido en 31 de marzo Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

El Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero ha sido nombrado el 20 de mayo Vocal Asesor de Expertos sobre Cuestiones Éticas, Económicas, Medio-Ambientales, Jurídicas y Sociales del Banco Nacional de ADN y, por Orden 1166/2004, de 28 de septiembre, miembro del Comité Asesor de Bioética de la Comunidad de Madrid.

El Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini ha tomado posesión el día 26 de mayo como Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales leyendo en el acto de su recepción el discurso titulado “Metodología de la Investigación: Los ejemplos de Freud y de Cajal”.

El Ilmo. Sr. D. Enrique García Maiquez ingresó el día 7 de junio en la Academia Iberoamericana de Farmacia como Académico Correspondiente pronunciando en su acto de recepción el discurso titulado “Los vinos de ida y vuelta”.

El Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García ha tomado posesión del cargo de Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en el que ha sido renovado por quinta vez, el día 23 de junio.

A la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto le ha sido concedida la condición de Doctora vinculada “Ad Honorem” al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y ha sido nombrada Vicepresidenta 2.^a en la Mesa del Instituto de España.

El Excmo. Sr. D. Eduardo Rodríguez Rovira ha sido reelegido el 29 de junio Presidente de la Confederación Española de Organización de Mayores (CEOMA).

El Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez ha ingresado el 4 de octubre como Académico Correspondiente en la Real Academia de Farmacia de Cataluña con el discurso titulado “Los remedios contra el envejecimiento”.

El Ilmo. Sr. D. Willy R. G. Baeyens ha sido investido como Doctor Honoris Causa en la Universidad Complutense de Madrid el día 26 de octubre.

El Muy Ilustre Sr. D. Miguel Ylla-Catalá i Genís ha sido nombrado en 20 de diciembre Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y el Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada ha

sido designado Presidente de la Academia de Ciencias e Ingenierías de Lanzarote.

Vaya para todos ellos nuestra más calurosa felicitación por las distinciones que les han sido concedidas en el Curso pasado.

* * *

En el Capítulo de **Publicaciones**, la Corporación ha editado dos Monografías, la número XIV titulada “Citocromo P-450”, publicada, como hemos citado anteriormente, en colaboración con el Instituto de España y de la que han sido editoras la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto y la Ilma. Sra. Dña. María José Gómez Lechón; y la número XV titulada “Nuevos Avances en Medicamentos”, publicada en colaboración con la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y con el patrocinio de la Fundación Caja Madrid, que ha sido coordinada por los Excmos. Sres. Dña. María del Carmen Avendaño López y D. Juan Tamargo Menéndez.

Se han editado tres números del volumen 70 de los “Anales” y el volumen extraordinario dedicado a los “Estudios sobre los Balnearios de Jaraba (Zaragoza)”, estando el número cuatro en trámite de impresión. También se ha publicado el n.º 56 del Anuario correspondiente al año 2004.

Con el patrocinio de la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia se han realizado tres publicaciones: “Aspectos sociosanitarios del Alzheimer”, “El Instituto de Salud Carlos III y la Investigación” y “Nuevas Oportunidades y Tecnologías en el Descubrimiento de Fármacos y Medicamentos”.

También hemos de destacar las publicaciones interdisciplinarias en las que nuestros Académicos han participado contribuyendo al conocimiento y a la difusión de la ciencia y la cultura, así el Instituto de España ha editado “Enfermedades Neurales y Neurodegenerativas. Nuevos avances moleculares y farmacológicos” a cargo de la Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal; nuestra Academia, en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina, ha dado a la luz “Síndrome Agudo Respiratorio Severo y Gripe Aviar”, mientras que en colaboración con el Museo Aboca de San Sepolcro (Italia), y con el patrocinio del Consejo General de Colegios Oficiales de

Farmacéuticos y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, ha publicado la titulada “Plantas Medicinales y su vinculación con la Farmacia a través de los siglos” como se ha citado anteriormente.

* * *

Respecto a la **Difusión del Conocimiento**, es de destacar que en el Curso 2004 la Corporación, a través de su página web, ha procurado información al público no solo de las diferentes actividades científicas que ha organizado sino que también ha incorporado monografías y números de los Anales cuya consulta es totalmente gratuita y por tanto accesible a cualquier ciudadano, así como algunas publicaciones editadas en colaboración con el Instituto de España, con la Real Academia Nacional de Medicina, las publicadas por la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y aquellas editadas por nuestra Corporación sobre los Estudios de aguas minero-medicinales de los balnearios españoles.

También se han incorporado a la página web los discursos de recepción de Académicos de Número y Correspondientes, los de inauguración de las Sesiones Inaugurales así como las Sesiones Necrológicas.

La página web ha sido consultada diariamente por numerosos visitantes entre los que se encuentran fundamentalmente los de países de habla hispana y en particular, independientemente de España, Méjico, Perú, Colombia y Argentina, lo que da idea del impacto de nuestra Academia en la sociedad.

Por otra parte, se ha iniciado la retransmisión, en video, de las Sesiones Científicas celebradas en nuestra sede, siempre que los conferenciantes han dado su autorización expresa, y se ha procedido a digitalizar en CD tanto las monografías y Estudios sobre las aguas minero-medicinales de los Balnearios de España, publicados por la Real Academia, como las publicaciones efectuadas por la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia para su archivo en Biblioteca y para su consulta en sala por el público.

* * *

El **Museo** ha contado con numerosos visitantes y con varias donaciones como son: Especialidades farmacéuticas antiguas por parte de la Dra. Dña. Carmen de la Rosa Jorge, Medicamentos: específicos y especialidades farmacéuticas por parte de la Dra. Dña. M.^a del Carmen Francés Causapé. El Dr. D. Leonardo Colapinto donó un plato de cerámica de la villa italiana Civita Castellana, regalado por el Alcalde de la misma con destino a esta Real Academia. Además, nuevamente este año, hemos de agradecer al Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo su sensibilidad ante el incremento del patrimonio de nuestro Museo que le ha llevado a donar un armario del siglo XVIII con frasería de farmacia del siglo XIX y XX. Desde estas líneas expresamos nuestro agradecimiento a tan generosos donantes

* * *

Hemos de hacer constar la **Cesión de dependencias de nuestra sede** para que se pudieran efectuar actos organizados por diversas Corporaciones, así la Real Academia de Doctores de España, la Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes, la Asociación Española de Farmacéuticos de Industria y la “Fundación Ferrer para la Investigación”.

Particular relieve ha revestido el acto de la entrega de los “Premios Sociosanitarios La Rebotica 2004” que tuvo lugar el día 30 de noviembre, que presidió S. M. la Reina Doña Sofía y durante el cual al Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata se le distinguió en representación de todos los cuidadores anónimos que dedican todas las horas del día a las personas enfermas de Alzheimer; S. M la Reina recibió del Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, D. Juan Manuel Reol Tejada, el Premio a la iniciativa sociosanitaria concedido al Proyecto Alzheimer de la Fundación Reina Sofía y se entregaron los Premios de la VIII edición del Premio de Cuentos “Don Daniel” de “La Rebotica”.

* * *

En cuanto al capítulo de **Restauración** se ha acometido una importante obra para adecuar los vertidos y evitar las humedades que afloraban en la zona de **Biblioteca** y en ésta se ha abordado una segunda fase de remodelación de su zona noble que ha comprendido

la zona de entrada y la sala de lectura que ha sido ampliada. Posteriormente se inició una tercera fase, que está finalizándose, en la que se está procediendo a instalar el nuevo mobiliario y los servicios generales que permitan el normal funcionamiento de esta dependencia.

No obstante, hemos de agradecer las donaciones que se han recibido para incrementar los fondos de esta dependencia y en particular las efectuadas por los Dres.: D. Leonardo Colapinto, D. José María de Jaime Lorén, D. Segundo Jiménez, D. Wolf-Dieter Müller Jahncke, D. Román de Vicente y D. Szabolcs Dobson.

Otra de las necesidades cubiertas ha sido la obligada renovación y adquisición de aparatos informáticos, de instrumental y material diverso para acometer los trabajos administrativos, informáticos y de comunicación que se han llevado a cabo.

* * *

Por último, no podemos dejar de hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia puesto que las subvenciones concedidas en este Curso 2004 nos han permitido acometer no solo las actividades programadas, las obras de restauración citadas y el funcionamiento de nuestra página web, sino también, en virtud al crédito extraordinario concedido, realizar algunas de las obras de mantenimiento que nuestro edificio requería.

Asimismo hemos de dar nuestras más expresivas gracias al Instituto de España por su financiación para que haya visto la luz la monografía n.º XIV, así como por la colaboración solicitada a nuestros Académicos para participar en las Actividades Científicas de carácter interdisciplinario que ha organizado.

También deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los patrocinadores del Concurso Científico puesto que con su contribución estimulan la labor científica de quienes participan en el mismo, y a los Patronos y miembros de la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación.

* * *

En el Capítulo de **Personal** hemos de señalar que durante el año 2004 han causado alta Dña. Angélica Meriel Méndez-Cabeza, en calidad de Auxiliar Administrativo, y D. Sergio Santamaría Expósito como Ordenanza.

Por otra parte, se ha concedido permiso al objeto de que el personal pudiera seguir diversos cursos de perfeccionamiento, así Dña. M.^a José Aliaga y Dña. M.^a del Mar Montes han realizado dos cursos sobre “Curso básico de Absys” y “Publicaciones periódicas y suscripciones”, y D. Marcos Orensa sobre “Administrador de Web Opac” y “Administrador del Sistema Integrado de Gestión Bibliotecaria de Absys”, todos ellos impartidos por la empresa informática Baratz.

* * *

Termino agradeciendo la colaboración prestada en las tareas académicas por todos los Académicos de Número y Académicos Correspondientes, y a las personas invitadas que han intervenido con interesantes conferencias y a todos los que han suministrado los textos que han formado parte de nuestras publicaciones.

Asimismo agradezco la colaboración prestada por el personal que se ocupa de las tareas de gestión, administración y servicios puesto que su labor constituye un pilar básico que ha hecho posible una vez más el desarrollo continuado de todas nuestras actividades en el Curso Académico 2004.

Eso es todo. Muchas gracias por su atención.

Madrid, 20 de enero de 2005
La Académica Secretaria
M.^a del Carmen Francés

Sesiones Científicas

7 de abril

Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. Intervinieron como ponentes: Excmo. Sr. D. Guillermo Tena Núñez: “Perfil humano de Domingo Espinós”; Excmo. Sr. D. Juan Jiménez Collado, Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina: “Domingo Espinós, su faceta humana e impronta universitaria”; Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona: “Domingo Espinós, Docente e Investigador”, y Excma. Sra. Dña. Ana M.^a Pascual-Leone Pascual: “Espinós Académico”.

14 de abril

Tertulia Científica sobre el tema “Influencia de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo”. Ponentes: Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero y Excma. Sra. Dña. Ana María Pascual-Leone Pascual.

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Profesor Dr. D. José Enrique O’Connor Blasco, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, quien pronunció su discurso titulado: “La Citómica y su aplicación a la investigación en Farmacología”. Fue presentado por la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto.

21 de abril

Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Profesora Dra. Dña. Juana González Parra, Catedrática del Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid, quien pronunció su discurso titulado: “El suelo: Integración del mundo orgánico y mineral”. Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

28 de abril

Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. Intervinieron como ponentes: Excmo. Sr. D. Federico López Mateos: “Segundo Jiménez: El químico, el maestro, el amigo”; Excmo. Sr. D. Gaspar González González: “Segundo Jiménez, químico agrario comprometido”, y Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona: “Segundo Jiménez Gómez, Académico eficaz”.

5 de mayo

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. D. Pedro Fito Maupoey, Catedrático de Universidad en el Área de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, quien pronunció su discurso titulado: “La complejidad y la funcionalidad en los alimentos con estructura celular: Una nueva metodología en la Ingeniería de Alimentos”. Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez.

12 de mayo

Conferencia por la Dra. Dña. Consuelo de la Torre García-Quintana, Académica Correspondiente, titulada: “Modulación de proliferación en respuesta a cambios estructurales del genoma”.

17 de mayo

Toma de Posesión como Académico de Honor del Excmo. Sr. D. Joan Massagué Solé, Chairman. Cancer Biology and Genetics Program. Howard Hughes Medical Institute Investigator. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Nueva York, Estados Unidos, quien pronunció su discurso titulado: “Oportunidades Farmacéuticas en Oncología Básica”. Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza.

19 de mayo

Conferencia por el Dr. D. Julio Cortijo Gimeno, Académico Correspondiente, titulada: “Nuevos aspectos de los inhibidores de la fosfodiesterasa en la farmacoterapia de las inflamaciones crónicas de vías aéreas”.

26 de mayo

Conferencia por el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número, titulada: “La pederastia y su tratamiento”.

2 de junio

Conferencia por el Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego, Académico de Número, titulada: “Nuevas bases para el diseño de supresores de la virulencia del Neumococo”.

9 de junio

Conferencia por el Dr. D. Juan Hernando Costa, Académico Correspondiente, titulada: “El Suelo y la Tierra”.

16 de junio

Acto Inaugural de la Exposición de Pintores Farmacéuticos. Exponen sus obras los Dres.: Dña. Juana González Parra, D. Francisco Femenía López, D. Casildo Martínez Crespo, D. Antonio Portolés Alonso, Dña. Rafaela Raposo González y D. Miguel Rubio Huertos.

Mesa Redonda sobre el tema: “La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra”. Coordinadora: Excma. Sra. Dña. M.^a del Carmen Francés Causapé. Intervinieron como ponentes: Dr. D. Mariano Turiel de Castro: “La figura de Miguel de Cervantes”; Dr. D. Juan Esteva de Sagrera: “La Farmacia en tiempos del Quijote”; Dr. D. José

Antonio Pérez Romero: “La Farmacia Hospitalaria en la Época Cervantina”; Dr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca: “Matices de inspiración alquímica en el texto del Quijote”; Dr. D. Ángel del Valle Nieto: “Preparados Oficinales en el Quijote”, y Dr. D. Eugenio Sellés Flores: “La Cosmética en el Quijote”.

23 de junio

Mesa Redonda de la Comisión de Aguas Mineromedicinales sobre el Balneario de Cervantes, en Santa Cruz de Mudela. Intervienen: Dra. Dña. Esperanza Torija Isasa: “Análisis Físico-Químico de las Aguas Mineromedicinales del Balneario de Cervantes”; Dres. D. Antonio Ramírez Ortega y D. Juan Ignacio Pinuaga Espejel: “Hidrogeología del Balneario de Cervantes”, y Dr. D. Francisco Javier Mantero Sáez: “Climatología del entorno del Balneario de Cervantes”.

Noticias

Nos comunican, el 6 de abril, el nombramiento de la Dra. D.^a Flora de Pablo Dávila, Académica Correspondiente de esta Corporación como Vocal Asesor del Consejo Nacional de Sanidad, del Ministerio de Sanidad y Consumo.

* * *

El día 7 de abril tuvo lugar en nuestra Sede el Homenaje Necrológico al Profesor Domingo Espinós Pérez, Académico de Número de las Reales Academias de Farmacia y Medicina, con asistencia del Presidente y Secretario del Instituto de España, Profesores Salustiano del Campo y Francisco Yndurain, respectivamente, así como del Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina, Profesor Jiménez Collado.

* * *

El día 14 de abril tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente, el Profesor Dr. D. José Enrique O'Connor Blasco, con la exposición del tema: «La citómica y su aplicación a la investigación en farmacología».

* * *

El día 18 de abril nos comunican la noticia de la entrevista que la Profesora Margarita Lorenzo Balado, Académica Correspondiente y Catedrática de Bioquímica de la UCM, concedió a la revista "Tribuna Complutense", donde habla de la diabetes tipo 2.

* * *

Nos comunican el día 20 de abril de la ratificación de nuestro Presidente, D. Juan Manuel Reol Tejada, como Consejero de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

* * *

El día 21 de abril, en nuestra Sede, se impuso la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio, por la Ministra de Educación, a nuestra compañera, la Excm. Sra. D.^a María Cascales Angosto.

* * *

El 21 de abril tomó posesión como Académica Correspondiente la Profesora Juana González Parra, Catedrática de Edafología de la Universidad Complutense.

* * *

El día 23 de abril falleció en su domicilio de Madrid, nuestro Presidente Honorario, el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz, maestro de maestros y máximo representante de la Bioquímica española. La noticia fue recogida por diversos medios de comunicación.

* * *

El 28 de abril tuvo lugar la Sesión Necrológica Homenaje al Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez.

* * *

El día 5 de mayo fue elegido Académico de Número de esta Corporación, el Excmo. Sr. D. Gonzalo Giménez, que ocupará la medalla 11.

* * *

El 5 de mayo tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente, el Profesor Fito Maupoey.

* * *

El día 10 de mayo, le fue entregado el Premio CEOE de Ciencias, en la Sede de su Fundación, a la Profesora Dra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Académica de Número de esta Institución.

* * *

El 17 de mayo tomó posesión de su plaza de Académico de Honor, el Excmo. Sr. D. Joan Massagué, recientemente galardonado con el Premio Príncipe de Asturias de Investigación, pronunciando su discurso reglamentario: «Oportunidades farmacéuticas en oncología básica». Le contestó, en nombre de la Corporación, el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza.

* * *

El 19 de mayo tomó posesión de su plaza de Académico de Honor de la Real Academia de Ciencias de Sevilla, el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva, siendo presentado por el Excmo. Sr. D. Manuel Losada, Académico de Honor de nuestra Corporación.

* * *

El 29 de mayo tomó posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia de Catalunya, el Profesor Dr. D. Alfonso Domínguez Gil-Hurlé, Académico de Número de esta Corporación. Fue presentado por el Dr. Francesc Taxonera.

* * *

El 2 de junio fue elegido Académico de Número de esta Real Academia el Profesor Dr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Decano de la Facultad de Farmacia de Alcalá de Henares que ocupará la medalla 22.

* * *

El 9 de junio fue elegido Académico de Número de esta Corporación, medalla 30, el Profesor Dr. D. José Luis Vila Jato, Catedrático de Farmacia Galénica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Necrológica

El Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz, Presidente Honorario de la Real Academia Nacional de Farmacia y Medalla número 27 de la misma, ha fallecido el día 23 de abril de 2005 en Madrid, rodeado del cariño y afecto de su numerosa familia.

Nació en Reinosa (Cantabria), el 19 de julio de 1912. Doctor en Farmacia y Medicina y Decano Honorario de la Facultad de Farmacia de Madrid. Luchador incansable por la calidad de la Universidad Española, fue consciente de la necesidad de impulsar en paralelo la investigación y la docencia para hacer frente al reto de ser europeos de pleno derecho. Poseedor de un extenso currículum investigador en donde destacaron sus estudios en oligoelementos y metabolismo energético, logró entusiasmar a muchos alumnos que dirigieron su esfuerzo hacia la entonces nueva ciencia llamada bioquímica, que floreció en el desierto de posguerra. En reconocimiento, la Sociedad Española de Bioquímica lo nombró Socio de Honor y en el año 1999 le concedió la Medalla de Oro de la Sociedad. Son muchos los galardones que ha recibido y sólo citaré algunos de ellos: Miembro de Número de la Real Academia de Medicina y de Doctores. Comandante Honorífico del Ejército. Miembro de la Academia Européenne des Sciences des Arts et des Lettres, de la New York Academy of Sciences, de las Academias Nacionales de Farmacia y de Medicina de Francia. Grandes Cruces de Sanidad, de Alfonso X El Sabio y del Mérito Docente con título de Magister. Doctor Honoris Causa por la Universidad de la Sorbona, de Cantabria, de Alcalá de Henares y de Navarra. Medalla de Oro de la Universidad Complutense, del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, de la Academia Internacional de Lutecia. Caballero de la Legión de Honor y Oficial de la Orden del Mérito Científico. Caballero de la Orden del Santo Sepulcro de Jerusalén, etc.

Todos estos honores, merecidos, no eran lo realmente importante de Don Ángel, sus discípulos lo encontrábamos como el puerto seguro construido sobre roca, a quien se podía pedir consejo y de quien se recibía la palabra de consuelo, o el aviso, que su mucha experiencia acumulaba, pues la vida no le fue fácil y le dio la visión

del sufrimiento y la adversidad, que solamente los hombres de su temple superan sin acritud ni amargura. Su larga vida, rodeado del cariño y respeto de todos, fue el mejor galardón a su temple y valía.

Con la memoria de D. Ángel en el recuerdo, pero contando con su legado, quisiera, a quien tanto amó la poesía, decirle hasta siempre con los versos de José Ángel Valente.

Llega al cabo la noche./ Regreso al fin al término seguro/ de mi casa y memoria./.../ Allí depongo/ el traje cotidiano polvoriento y ajeno./ Solemne me revisto/ de mis ropas mejores//Vengo a la compañía de los hombres antiguos/ que en amistad me acogen/.../ Con ellos hablo, de ellos tengo respuesta/ acerca de la ardua o luminosa/ razón de sus acciones.

Que tan buen Maestro haya encontrado respuesta a todas sus preguntas y descanse en paz entre los justos.

M.^a Teresa Miras-Portugal
Editora de los Anales de la RANF

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Características

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral en la que se considerarán para publicación aquellos trabajos relacionados con los diversos campos de las ciencias farmacéuticas y afines, orientadas a la investigación básica o aplicada.

2. Fundamentalmente, la revista constará de las siguientes secciones:

REVISIONES: Se dedicará a estudios de actualización y puesta a punto de distintos temas, siendo realizados por personas expertas en cada tema y a petición de la Comisión de Publicaciones. Podrán aceptarse revisiones y artículos doctrinales no solicitados, después de una consideración particular por parte del Consejo de Redacción.

ARTÍCULOS ORIGINALES: Se publicarán aquellos trabajos de investigación con interés en el campo de las ciencias farmacéuticas y afines, que no hayan sido publicados previamente. Su exposición se ajustará a un estilo conciso y la extensión dependerá del volumen de resultados, que deberán ser rigurosos y originales en su aportación.

COMUNICACIONES BREVES: Incluirán la descripción de observaciones y resultados de investigaciones en curso, cuyo interés justifique el que los autores quieran dar una rápida noticia. Su texto no excederá de cinco hojas A4 (a doble espacio), con 2-3 figuras/tablas como máximo y sin sobrepasar 10-12 referencias abreviadas en su bibliografía.

INFORMACIÓN ACADÉMICA: Dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros y otras visicitudes académicas, así como otras informaciones o novedades editoriales que la revista juzgue puedan ser de interés para los lectores.

B. Instrucciones para la preparación de manuscritos

1. **PRESENTACIÓN.** De cada trabajo se enviarán a la Secretaría de la Real Academia Nacional de Farmacia un original y dos duplicados. Asimismo, se remitirán los originales escritos y grabados en Word.

En la primera página se hará constar: Título del trabajo (en español y en inglés), autores y centro donde se ha realizado el trabajo, incluyendo su dirección, teléfono y correo electrónico si lo tiene. También se incluirá un título abreviado en 3 ó 4 palabras.

En la segunda página se repetirá el título del trabajo y se incluirá un resumen (máximo 200 palabras) en español y en inglés. A continuación de los resúmenes se incluirá hasta un máximo de 5 palabras claves.

Los trabajos de revisión, en español o inglés, deberán aportar un amplio resumen (1-2 hojas A4) en el otro idioma distinto al que se ha redactado el trabajo «in extenso», que, además, irá acompañado de su resumen normal (máximo 200 palabras).

2. **REDACCIÓN DEL TEXTO.** Los originales se presentarán en A4 a un espacio, con el siguiente formato: tipo de letra «Times New Roman»; tamaño: 12. Márgenes: superior, 6 cm.; inferior: 6 cm.; izquierda: 4,2 cm.; derecha: 4,2 cm. Encabezado y pie de página: 5,2 cm. Número de palabras: 10.000. Máximo de páginas: 30. Ilustraciones: 8 máximo.

En los trabajos experimentales se recomienda la presentación de una parte crítica o introducción, una parte experimental y una discusión de los resultados. También, cuando se considere necesario, podrá incluirse un apartado de agradecimientos.

La introducción, en la cual se expondrán los fines y objetivos, deberá ser lo más breve posible. Se hará referencia explícita a todo trabajo anteriormente pu

blicado por el mismo autor o por otro autor si el conocimiento de esos trabajos es esencial para situar, en el desarrollo científico, el texto presentado. La parte experimental no deberá contener más que los datos necesarios para la reproducción de los experimentos.

En las Comunicaciones breves, la justificación, planteamiento del problema, método y resultados, junto con sus comentarios, irán redactados siguiendo un proceso argumental lógico y sin distinción de apartados. Irán acompañados de un breve resumen en español y en inglés.

3. SÍMBOLOS. En la redacción el autor se atenderá a las normas S.I. (Sistema Internacional) en lo que respecta a unidades, símbolos y abreviaturas.

4. BIBLIOGRAFÍA. Las citas bibliográficas irán al final del original, correlativamente numeradas, por orden de aparición en el texto. Tamaño letra: 10.

Para la denominación de las revistas, se utilizarán las abreviaturas publicadas por Chemical Abstracts, Bibliographic Guide for Editor & Authors. C.A. 1974.

Los siguientes ejemplos pueden servir de modelo:

a) Para artículos publicados en revistas:

Autor en versales; título de la revista en cursivas:

DUNNE, A. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 97-101.

b) Para libros:

Autor en versales; título del libro en letra normal:

BARTOS, J. Y PESEZ, M. (1984) *Practique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique*. 2^a édition. Masson. París.

5. TABLAS Y FIGURAS. Salvo casos muy excepcionales, no se emplearán simultáneamente ambas formas de expresión. El número de figuras se limitará al mínimo, procurando yuxtaponer aquellas gráficas que, sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.

Las figuras podrán enviarse sobre papel, en fotografía, en diapositiva o en

disco en formato TIFF, JPG... Los autores indicarán la reducción de las figuras que estimen conveniente.

La rotulación será del tamaño adecuado para que, una vez reducida la figura, resulte de 1,5 mm de altura.

Los pies de las figuras, suficientemente explicativos, deberán enviarse en una página al final del trabajo.

La situación aproximada de las figuras en el texto deben señalarse mediante un recuadro: debajo de este recuadro se indicará el número de la figura.

6. CARACTERES DE IMPRENTA. Se ruega a los autores que expresen, en sus originales, los estilos de caracteres de letra que deban emplearse de acuerdo con las indicaciones siguientes:

— Subrayar con una línea — las palabras en *cursiva*.

— Subrayar con dos líneas == las palabras en *VERSALES*.

— 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.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

A. Characteristics

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* 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 Editorial Board, not requested reviews could be accepted.

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.

SHORT 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 SECRETARÍA DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA. 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

address (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.

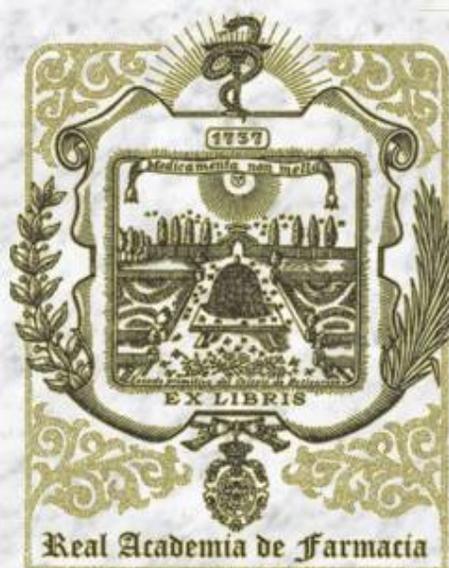
— Triple underline - CAPITAL LETTERS.

— 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