

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2005

VOLUMEN LXXII

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

The TGF β pathway in basic oncology *

JOAN MASSAGUÉ

*Cancer Biology and Genetics Program, Howard Hughes Medical
Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*

ABSTRACT

The transforming growth factor- β (TGF β) family is particularly prominent among growth factors controlling cell proliferation and differentiation, and fosters tissue growth and morphogenesis during embryogenesis in organisms as diverse as the nematode, fruit fly, and human. To elucidate the basis for the great diversity of TGF β responses in different cell types, we delineated the pathway linking membrane TGF β receptors to target genes. TGF β assembles a receptor complex in which the type II receptor kinase phosphorylates and activates the type I receptor. This type I receptor phosphorylates and activates Smad transcription factors. A receptor-activated Smad complex enters the nucleus to find partners for the recognition and regulation (activation of repression) of specific genes. TGF β signaling decreases CDK activity and causes the repression of several growth-promoting genes. The TGF β pathway, when altered, plays an essential role in tumorigenesis and metastasis.

Key words: TGF β .—Smad.—Cyclins.—CDKs.—Cell cycle.—Metastasis.

RESUMEN

La vía del TGF β en oncología básica

La familia del factor de crecimiento transformante- β (TGF β) se destaca particularmente entre los factores de crecimiento como regulador de la proliferación y

* Revisión realizada con motivo de la toma de posesión como Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, 17 de mayo de 2005.

diferenciación celular. El TGF β promueve el crecimiento de los tejidos y la morfogénesis durante la embriogénesis en organismos tan diversos como nematodos, mosca de la fruta y humanos. Para elucidar las bases de esta gran diversidad de respuestas del TGF β en diferentes tipos celulares, hemos trazado la vía que comunica los receptores de membrana del TGF β con los genes diana. El TGF β forma un complejo receptor en el cual la quinasa del receptor tipo II fosforila y activa el receptor tipo I. Este receptor tipo I fosforila y activa los factores de transcripción Smad. Una vez activados, los factores Smad entran en el núcleo con el fin de formar complejos para el reconocimiento y regulación (activación o represión) de genes específicos. La señalización del TGF β hace disminuir la actividad CDK y provoca la represión de distintos genes promotores del crecimiento. La vía del TGF β , cuando se altera, juega un papel esencial en la tumorigénesis y en la metástasis.

Palabras clave: TGF β .—Smad.—Ciclinas.—CDKs.—Ciclo celular.—Metástasis.

INTRODUCTION

The basic functions of a metazoan cell- its metabolism, proliferation, differentiation, integration into the tissue structure, and eventual death- are controlled by a dense network of polypeptide growth factor signals. The transforming growth factor- β (TGF β) family of growth factors is particularly prominent among this type of signals. TGF β fosters tissue growth and morphogenesis during embryogenesis in organisms as diverse as the nematode, fruit fly, and human (1). In the adult, however, TGF β delivers cytostatic and cell death signals. These responses help maintain tissue homeostasis, and their loss contributes to tumor development (2). Cancer cells that avert TGF β -mediated cytostasis may then use this factor with impunity to exacerbate their own proliferative, invasive, and metastatic behavior. We are defining the mechanism by which TGF β and related factors achieve growth control, and how normal control is disrupted in cancer and results in metastasis.

THE TGF β PATHWAY

To elucidate the basis for the great diversity of TGF β responses in different cell types, we delineated the pathway linking membrane TGF β receptors to target genes. At the cell surface, TGF β activates a

protein complex comprising subunits known as the type I and type II receptors (Figure 1) (3). Both subunits are serine/threonine kinases. Phosphorylation by the type II receptor enables the type I receptor to recognize and phosphorylate Smad2 and Smad3 (4, 5). Phosphorylation by the TGFβ receptor releases the Smad proteins from cytoplasmic retention, allowing their translocation into the nucleus, where they form transcriptional regulatory complexes (Figure 1). These complexes generate hundreds of immediate gene activation and repression responses. Structural analysis of these components has shed light into how they interact and become activated in response to TGFβ (Figure 1) (3). We are now identifying how the TGFβ pathway is integrated into the signaling networks of the cell.

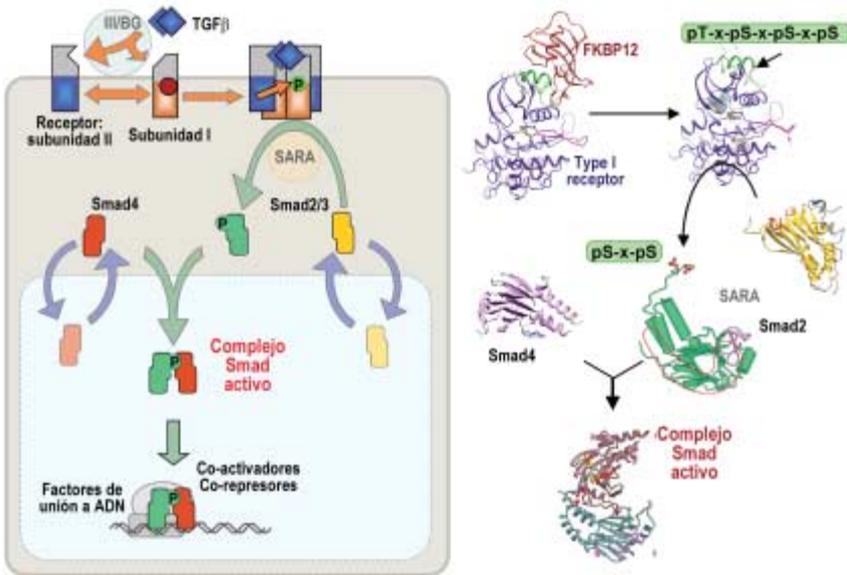


FIGURE 1. *The TGFβ/Smad pathway. The ligand TGFβ assembles a receptor complex in which the type II receptor kinase phosphorylates and activates the type I receptor. Receptor I phosphorylation by receptor II in the regulatory region (GS region) creates a double pS/T-x-pS motif, turning an inhibitor (FKBP12) binding site into a substrate binding site (18, 19). This allows the type I receptor to phosphorylate and activate Smad transcription factors. Smad phosphorylation by receptor I creates a C-terminal pS-x-pS motif for formation of Smad dimers and trimers that nucleate transcriptional complexes (20-22). A receptor-activated Smad complex enters the nucleus to find partners for the recognition and regulation (activation of repression) of specific genes.*

THE TGF β CYTOSTATIC PROGRAM

How does an activated Smad complex regulate different genes in different cell types? And how does it activate certain genes while repressing others in the same cell, at the same time? A general framework for the resolution of these important questions is provided by the hypothesis that Smads function in association with different protein partners (6). Each Smad-partner combination would target a particular subset of genes, depending on the DNA-binding specificity of this combination. The availability of such cofactors, which may vary depending on the cell type, partly determines the gene responses to TGF β in each cell type. Identifying Smad partners therefore is essential for delineating cell-specific programs of TGF β action and their integration in the signaling networks of the cell.

We have pursued this general problem in the context of delineating the TGF β cytostatic program. This program involves transcriptional activation of the cyclin-dependent kinase inhibitors *p21^{Cip1}* and *p15^{Ink4b}* and repression of the growth-promoting transcription factors *c-myc* and *Id1* (Figure 2) (7). The increased levels of p15 and p21 lead to the mobilization of p27 Kip1, a key CDK inhibitor that blocks the cyclin-Cdk2 complexes (Figure 3) (8). Cooperatively, these responses arrest the cell division cycle. We recently identified DNA-binding cofactors that in association with TGF β -activated Smad target these genes for activation or repression. A Smad-FoxO complex targets *p21^{Cip1}* for activation (9), whereas Smad-E2F4/5 and Smad-ATF3 complexes target *c-myc* and *Id1* for repression, respectively (Figure 2) (10, 11). c-Myc plays an integrative role in this process: when present at high levels, as in mitogen-stimulated cells, c-Myc binds to the *p21^{Cip1}* and *p15^{Ink4b}* promoters via the zinc finger protein Miz-1, interfering with activation of these genes by TGF β , the tumor-suppressor p53, and other signals (12, 13). c-Myc down-regulation therefore renders *p21^{Cip1}* and *p15^{Ink4b}* competent for activation.

The resulting working model of TGF β action is that each one in a vast repertoire of DNA-binding cofactors endows the Smad complex with the ability to recognize a limited subset of target genes. This model, which is being extended and verified in other gene response

programs, may explain the diversity of responses that each member of the TGF β family can induce in different cell types (6). It also provides a framework for interventions to alter one TGF β response without affecting others.

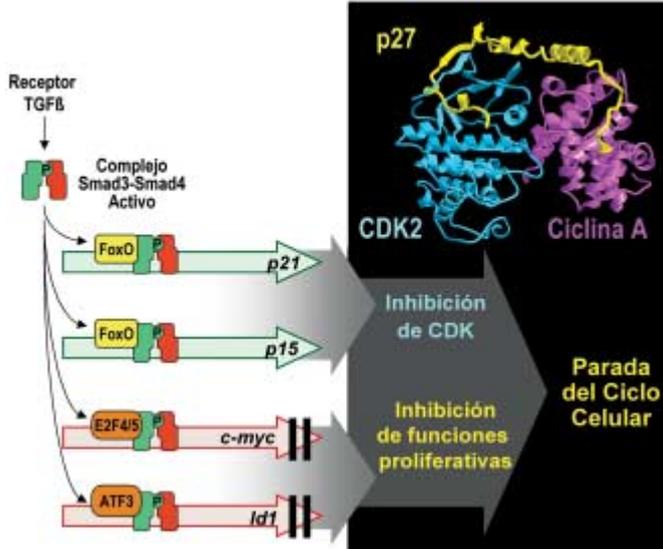


FIGURE 2. The TGF β /Smad cytotostatic program. In the nucleus, receptor-activated Smad3/4 complexes containing FoxO factors as partners, activates genes encoding CDK inhibitors p15Ink4b and p21Cip1. The increased levels of p15 and p21 cooperate with another CDK inhibitor, p27Kip1, to block cyclin-dependent protein kinases. The crystal structure of the p27-cyclinA-cdk2 complex reveals how a CDK inhibitor docks on the cyclin subunit to direct its CDK inhibitory domain to disrupt the catalytic center of the CDK kinase (23). Through this mechanisms, TGF β signaling decreases CDK activity while, through Smad complexes with E2F4/5 and ATF3 as partners, TGF β signaling causes the repression of the growth-promoting genes Myc and ID1.

MECHANISMS OF METASTASIS

Having shed light on the cytotostatic action of TGF β , its underlying molecular mechanisms, and their disruption in cancer, we are also directing our attention to aberrant gene responses that enable invasion and metastasis in tumor cells. More generally, we are interested in elucidating mechanisms mediating tissue-specific metastasis. Metastasis is the most devastating complication of

cancer, being responsible for a vast majority of deaths from solid tumors. Tumor cells become metastatic by the progressive acquisition of functions enabling invasion, survival and growth under adverse conditions in distant organs. Metastasis, a complex process caused by elaborate interactions between tumor cells and the surrounding normal tissues in different vital organs. The molecular and cellular mechanisms that lead primary tumors to form metastases must be understood in order to better address this major life-threatening problem. Previous work provided a sense of the complexity of the metastasis process (Figure 3), but it did not explain how and why metastasis occurs, what mechanisms make metastasis a tissue-specific process, what events allow dormant metastases to become active and lethal many years after removal of a primary tumor, and what metastasis-mediating genes would eventually constitute worthy therapeutic targets. As a result of such limitations, progress to date has been frustratingly slow.

Our experimental approach is based on the use of moderately metastatic cell lines and a mouse model system for the selection of highly metastatic subpopulations. Live-animal-imaging techniques are used to track the spread, homing, and outgrowth of the metastatic cells in different organs. After harvesting metastatic lesions and verifying that highly metastatic cells have been selected, we use genome-wide transcriptomic profiling to identify metastasis-linked genes. Gene transfer techniques are then used to assess the contribution of individual genes to various steps (invasion, homing, outgrowth, angiogenesis, and stroma adaptation) of the metastasis process. With this approach, we have recently identified different sets of genes that cooperatively mediate breast cancer metastasis to the bone and to the lung (Figure 3) (14, 15). Ongoing studies are directed at establishing the clinical relevance of these findings and identifying additional tissue-specific metastasis genes in other tumor types and for other metastasis sites.

FROM TUMOR SUPPRESSOR TO METASTASIS MEDIATOR

Metastatic functions may be acquired by abnormal utilization of cellular pathways that otherwise play important roles in normal

tissue development and maintenance. One of these is the TGF β pathway, which induces cyto-stasis and apoptosis under normal conditions and is disabled by inactivating mutations in the TGF β receptors or the signal transducer Smad transcription factor in various types of tumors.

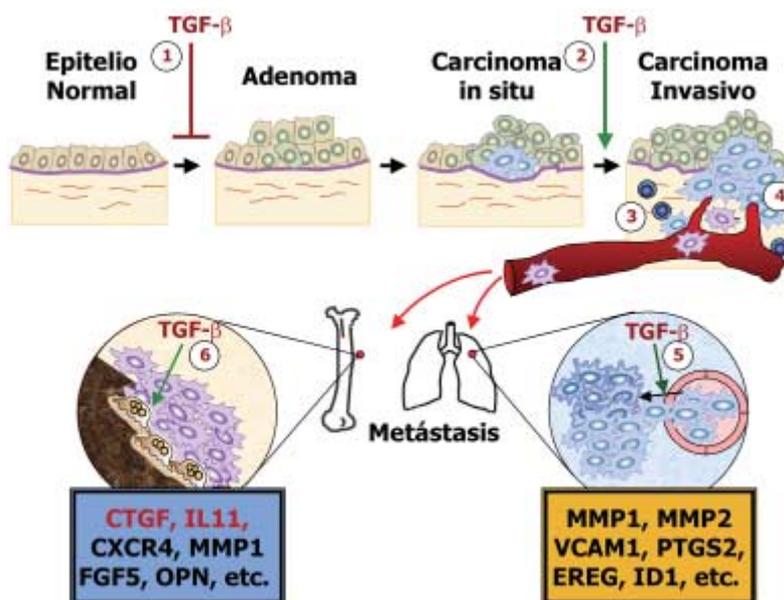


FIGURE 3. Mechanisms of metastasis. 1) TGF- β limits the growth of normal epithelium and early-stage tumors. 2) Loss of growth inhibitory responsiveness by loss of TGF- β receptors or Smad proteins, or by specific loss of cyto-static gene responses, selects for more aggressively growing tumors, facilitating the acquisition of additional oncogenic mutations. 3) Tumor cells that have lost the cyto-static response but retain TGF- β signaling components can undergo epithelial-mesenchymal transdifferentiation in response to TGF- β , becoming more invasive. 4) Tumor-derived TGF- β creates an immunosuppressive environment by suppressing T cell function, allowing tumor cells to escape CTL-mediated clearance. 5) TGF- β can induce an angiogenic response, facilitating the recruitment of new blood vessels that sustain tumor growth and systemic spread. 6) Adherence of tumor cells to the endothelium and/or extravasation of tumor cells at sites of metastasis, such as the lung, can be augmented by TGF- β signaling. 7) TGF- β stimulates the expression of genes such as the osteoclast differentiation factor IL11 and the angiogenic factor CTGF, which promote osteolytic bone metastasis by breast cancer cells. Genes that mediate organ-specific metastasis by breast cancer cells have been identified by a combination of *in vivo* selection of metastatic cells, bioinformatics identification of metastasis-linked genes, functional verification of the metastatic activity of these genes, and clinical validation of their relevance to human disease (15).

Often, however, the strong selective pressure for loss of TGF β growth inhibitory responsiveness in cancer leads to the accumulation of defects in cytostatic mechanisms downstream of the Smads. Tumor cells that become resistant to antimitogenic control in this manner may display a corrupt sensitivity to TGF β undergoing tumorigenic progression in response to this cytokine (2). Patients whose pancreatic or colon tumors express TGF β receptors fare less well than those with low or absent TGF β receptor expression in the tumor. In mouse models of breast cancer, TGF β signaling promotes extravasation of circulating tumor cells in the lung (16) and formation of bone metastasis by human breast cancer cells (17).

The TGF β signaling mechanisms that foster metastasis and their relevance in human cancer, are important open questions. In the case of osteolytic bone metastasis by breast cancer cells, it has been proposed that TGF β released from the decaying bone matrix stimulates neighboring tumor cells, establishing a vicious cycle that exacerbates the growth of the metastatic lesion. The role of TGF β as a pro-metastatic factor raises questions about the signal transduction pathways involved. Probably owing to selective pressure against this cytostatic action in cancer, *SMAD4* (also known as *Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4, DPC4*) and, to a lesser extent *SMAD2* are mutationally inactivated in cancers of the colon, pancreas and other sites (7). Because Smads function as quintessential tumor suppressors, one might think that the pro-invasive and metastatic effects of TGF β are mediated by Smad-independent pathways. However, the possibility that the Smad pathway may mediate metastatic effects has not been ruled out, nor has it been tested in vivo.

Among the bone metastasis genes that we recently identified, two genes, interleukin 11 (IL11) and connective tissue growth factor (CTGF) are of special interest (14). IL11 is an enhancer of osteoclast differentiation and osteolysis, and CTGF is an angiogenic and growth-promoting factor. *IL11* and *CTGF* are inducible by TGF β , providing a possible mechanism for the pro-metastatic activity of TGF β in breast cancer. Our work has shown that the Smad pathway mediates *IL11* and *CTGF* activation and the development of bone metastasis in breast cancer (14). Thus, the tumor suppressor Smad pathway becomes corrupted in breast cancer, acting as a mediator of metastasis.

Through this combined approach, and encouraged by its recent validation in clinical samples, we hope to provide a better understanding of the mechanisms mediating metastasis, a better definition of the role of corrupt TGF β signaling in this process, and a better rationalization for the therapies that could be applied.

REFERENCES

- (1) MASSAGUÉ, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.
- (2) SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3: 807-821.
- (3) SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. (2003). Mechanism of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
- (4) WRANA, J. L.; ATTISANO, L.; WIESER, R.; VENTURA, F.; MASSAGUÉ, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-347.
- (5) LIU, F.; HATA, A.; BAKER, J. C.; DOODY, J.; CARCAMO, J.; HARLAND, R. M.; MASSAGUÉ, J. (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620-623.
- (6) MASSAGUÉ, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 169-178.
- (7) MASSAGUÉ, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309.
- (8) POLYAK, K.; LEE, M. H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; KOFF, A.; ROBERTS, J. M.; TEMPST, P.; MASSAGUÉ, J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66.
- (9) SEOANE, J.; LE, H. V.; SHEN, L.; ANDERSON, S. A.; MASSAGUÉ, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211-223.
- (10) CHEN, C. R.; KANG, Y.; SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ, J. (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19-32.
- (11) KANG, Y.; CHEN, C. R.; MASSAGUÉ, J. (2003) A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11: 915-926.
- (12) SEOANE, J.; POUPONNOT, C.; STALLER, P.; SCHADER, M.; EILERS, M.; MASSAGUÉ, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat. Cell Biol.* 3: 400-408.
- (13) SEOANE, J.; LE, H. V.; MASSAGUÉ, J. (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419: 729-734.

- (14) KANG, Y.; SIEGEL, P. M.; SHU, W.; DROBNJAK, M.; KAKONEN, S. M.; CORDON-CARDO, C.; GUISE, T. A.; MASSAGUÉ, J. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-549.
- (15) MINN, A. J.; GUPTA, G. P.; SIEGEL, P. M.; BOS, P. D.; SHU, W.; GIRI, D. D.; VIALE, A.; OLSHEN, A. B.; GERALD, W. L.; MASSAGUÉ, J. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* in press.
- (16) SIEGEL, P. M.; SHU, W.; CARDIFF, R. D.; MULLER, W. J.; MASSAGUÉ, J. (2003) Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 8430-8435.
- (17) YIN, J. J.; SELANDER, K.; CHIRGWIN, J. M.; DALLAS, M.; GRUBBS, B. G.; WIESER, R.; MASSAGUÉ, J.; MUNDY, G. R.; GUISE, T. A. (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103: 197-206.
- (18) HUSE, M.; CHEN, Y. G.; MASSAGUÉ, J.; KURIYAN, J. (1999) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96: 425-436.
- (19) HUSE, M.; MUIR, T. W.; XU, L.; CHEN, Y. G.; KURIYAN, J.; MASSAGUÉ, J. (2001) The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell.* 8: 671-682.
- (20) WU, G.; CHEN, Y. G.; OZDAMAR, B.; GYURICZA, C. A.; CHONG, P. A.; WRANA, J. L.; MASSAGUÉ, J.; SHI, Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287: 92-97.
- (21) WU, J. W.; HU, M.; CHAI, J.; SEOANE, J.; HUSE, M.; LI, C.; RIGOTTI, D. J.; KYIN, S.; MUIR, T. W.; FAIRMAN, R., et al. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell.* 8: 1277-1289.
- (22) SHI, Y.; WANG, Y. F.; JAYARAMAN, L.; YANG, H.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94: 585-594.
- (23) RUSSO, A. A.; JEFFREY, P. D.; PATTEN, A. K.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N. P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382: 325-331.

Aceleración y frenado de la proliferación celular*

CONSUELO DE LA TORRE GARCÍA-QUINTANA
*Académica Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

Las células de plantas poseen análogos estructurales y funcionales de los complejos CDK-ciclina de levaduras y animales que permiten iniciar o avanzar la proliferación celular. Las células vegetales presentan además versiones específicas de CDKs y ciclinas sin homología con las del hombre, tales como las implicadas en citocinesis, un proceso que difiere en ambos reinos. Finalmente, las plantas no sólo poseen homólogos de la CAK humana (CDKDs) que activan otras CDKs por fosforilación de una treonina situada en su lazo T, sino también otra segunda CAK (CDKF1) y un grupo de ciclinas, las P, que son homólogas de las existentes en levaduras. Ello apoya una historia de endosimbiosis ocasional entre levaduras y la célula precursora de plantas, con transmisión horizontal de genes. Las plantas también conservan los mecanismos de frenado por rutas de chequeo que retrasan la activación de CDKs, generalmente al evitar la defosforilación de la treonina14 y la tirosina 15 mediante inhibición de la fosfatasa Cdc25 o sus homólogos funcionales, cuando las condiciones de la propia célula son inadecuadas para afrontar sin riesgos una transición irreversible entre fases consecutivas del ciclo.

Palabras clave: Quinasas dependientes de ciclinas.—Ciclinas.—Transmisión de señales antimitogénicas.—Rutas de chequeo.

* Revisión realizada con motivo de la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el 20 de enero de 2005.

ABSTRACT**Acceleration and brake of cell proliferation**

Plants possess the structural and functional homologs of the yeast and human CDK-cyclin complexes, apart from some specific ones as those that participate in cytokinesis, a process that differs essentially in plant and animal cells. Apart from the human CAK homologue that activates CDKs by phosphorylating the threonine residue in the T-loop, plant cells have an additional CAK (CDKGF1) and a whole group of cyclins, the P ones, that are orthologues of the yeast ones. This unveils an occasional endosymbiotic process with a horizontal gene transfer between yeast and plant genomes. Plant cells also possess the braking mechanisms that prevent CDK activation to face an irreversible transition between subsequent cycle phases when the cell is not completely ready for it. Such mechanisms mostly prevent CDK activation by inhibiting dephosphorylation of the CDK threonine14-tyrosine15 residues brought about by the Cdc25 phosphatase plant homolog.

Key Words: Cyclin-dependent kinases.—Cyclins.—Antimitogenic signal transduction.—Checkpoints.

EXTENSIVE ABSTRACT

Most cyclin-dependent kinases and cyclins found in plant cells are structural and functional homologs of those found in human cells. However, other components of the cycle machinery are plant specific, as the plant B1-type CDKs that co-localize with the microtubular assemblies responsible for the division of cytoplasm, i.e. the preprophase band of microtubules and the phragmoplast.

In relation to the general principle of CDK activation by phosphorylation of the T160 residue mediated by the CAKs (*CDK-activating kinases*), plant cells have the peculiarity of possessing, in addition to the CDK type D catalytic subunits of CAKs homologue to those in man, an alternative CDK type F subunit and a whole group of cyclins (the P ones) that are homologues to those in yeast. They may result from horizontal transmission of genes from yeast to plant cells by occasional endosymbiosis, one of the recently postulated motors of evolution.

Plant cells possess as many CDKs and more cyclins than do mammalian cells. Cyclins integrate the transcriptional control into the proliferative cycle. This is because of their synthesis in precise times of the cycle. In the case of the mitotic cyclins, this is supported by the presence of a Myb-like element in their promoters that is shared by other mitotic proteins. Additionally, cyclins are labile because they are targeted to proteolysis by the proteasome by the binding of poly-ubiquitin tails shortly after their synthesis. Our group has shown that the B2;2 cyclin is one positive rate-limiting regulator of late interphase progression, with a role in the induction of mitotic chromosomal condensation similar to that played by the A-cyclin in mammals. Their proteolysis coincides with the entry into the irreversible portion of prophase in both plant and animal cells.

Superimposed to the CDK-induced activation of cycle progression, plant cells also possess a series of checkpoint controls that ensures safe irreversible transitions. They depend on sensor molecules and specific kinases working early in checkpoint signal transduction such as the ATM/ATR ones. By the way, the lack of the ATM kinase induces the ataxia-telangiectasia in humans, a cancer-prone condition. This kinase is also present in plants. The checkpoint response is followed by a signal transduction chain that is completed by the effector kinases CHK1 and CHK2 that may prevent the activation of the CDK.

The major checkpoints recognised in plants are the following: 1) one that controls the transition from quiescence to proliferation, under the so-called retinoblastoma (RB) pathway 2) the one controlling the onset of replication (G1 to S transition), 3 and 4) two intra-S checkpoints (at the start of elongation of the newly synthesized DNA chains from both early and late replicating origins, respectively), 5) the G2 checkpoint controlling entry into mitosis, and 6) the spindle checkpoint that regulates the metaphase to anaphase transition.

The physiology of checkpoints in plant cells has shown, first, that checkpoint signal transduction mechanisms are dispensable at the first cycles after the stimulation of cell proliferation in previously dormant tissues. At each checkpoint, multiple cellular conditions are checked to give rise to a single mitogenic or antimitogenic output. The content in positive rate-limiting molecules as plant cyclin B2;2 is also computed by checkpoints. Moreover, there are redundant checkpoint routes for each single irreversible transition between cycle phases. As a consequence of these properties, checkpoints can be spontaneously overridden without accomplishment of the specific requirement that activated them. Though this is known as adaptation, it is actually an undue override of checkpoints without fulfilment of a crucial requirement. Such checkpoint override results in the appearance of genome instability that initiates an experiment in microevolution.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la biosfera depende, en última instancia, de la capacidad proliferativa, multiplicadora, de las células de los organismos que la forman. La proliferación celular no sólo permite el crecimiento en número de células de todos los seres vivos a partir del cigoto, sino también la renovación de las células viejas o dañadas presentes en los tejidos de individuos adultos. El ciclo es sólo un modelo que esquematiza los procesos que tienen lugar en las células durante su proliferación.

La replicación del ADN y su reparto entre las dos células que resultan de una mitosis tienen lugar en las fases S (o de síntesis de ADN) y M (Mitosis), respectivamente. En G1 y G2 se produce la

auto-valoración de la capacidad celular para enfrentarse a la transición a la fase siguiente, así como la integración de señales procedentes de otras células sobre la conveniencia o no de iniciar o continuar, en su caso, el proceso de proliferación.

Las células quiescentes con contenido de ADN 2C (idéntico al de las células G1) se dice que se encuentran en G0. Por el contrario, las que poseen el contenido G2 (4C) se dice que se encuentran en periodo G0,2 o periodo R. Ante un exceso de señales mitogénicas, las células quiescentes pueden reprogramarse para proliferar de nuevo.

Por otra parte, cuando la proliferación se vuelve incontrolada, aumenta el número de células que forman un tejido. Esto tiene consecuencias negativas sobre ese tejido, sobre otros tejidos e incluso sobre el organismo como un todo. Dicho crecimiento incontrolado se conoce, en las células humanas, como cáncer.

1. UNIVERSALIDAD DE LA MAQUINARIA QUE HACE AVANZAR A LA CÉLULA A TRAVÉS DEL CICLO

Pero ¿cuál es el factor citoplásmico que hace progresar a la célula por el ciclo celular? En 1988 se describió el complejo proteico bautizado como MPF (*Maturation Promoting Factor*) que induce la maduración de oocitos en *Xenopus*. El MPF es un heterodímero formado por una quinasa dependiente de ciclina (CDK) y una ciclina de las llamadas B o mitóticas como subunidad reguladora. Su presencia en la célula induce la condensación cromosómica que caracteriza tanto la transición de G2 a mitosis como a meiosis, previa fosforilación de residuos de serina y treonina en la histona H1 internucleosomal, entre otras dianas. Lo extraordinario es que tanto la CDK como la mitótica son comunes a todas las células eucarióticas (1). La CDK de *Schizosaccharomyces pombe* es el producto del gen *Cdc2*, siendo sus ortólogos CDC28 en *S. cerevisiae*, CDKA en plantas y CDK1 y 2 en animales.

Las quinasas que constituyen la herramienta que controla la replicación del ADN de la célula y su segregación entre las dos células hijas que se originan al final de la mitosis, son polipéptidos de unos 43 kDa de masa, de estructura bilobulada, su extremo amino-terminal formando el lóbulo menor (Fig. 1). En la hendidura entre ambos

lóbulo se encuentra el dominio catalítico de la quinasa, donde tiene lugar la fosforilación de sus sustratos. El lóbulo mayor se pliega sobre la hendidura, en lo que se conoce como lazo T, cubriendo parcialmente su entrada.

Monómero CDK (inactivo)



FIGURA 1. Esquema mostrando la estructura básica de la quinasa dependiente de ciclina (CDK), como monómero inactivo. Se muestran, a la izquierda, los sitios que son susceptibles de cambiar su actividad por fosforilación. Mientras que la fosforilación de la treonina 160 en el llamado lazo T se requiere para la activación de la quinasa, la fosforilación de la treonina 14 y tirosina 15 la mantienen inactiva. El sitio catalítico se encuentra dentro de la hendidura catalítica. La secuencia PSTAIRE permite a la CDK ensamblarse con una ciclina para así transformarse en activa.

La secuencia PSTAIRE (prolina, serina, treonina, alanina, isoleucina, arginina y ácido glutámico) de la quinasa es la región a la que se ensambla una ciclina, para activarla. Las diferentes ciclinas proporcionan a la CDK especificidad de sustrato y, con ello, especificidad de las transiciones entre fases del ciclo celular que controlan.

Los genes para CDKs y ciclinas ejercen el control positivo sobre el ciclo celular, es decir, son responsables de la progresión unidireccional de la célula proliferante hacia etapas más avanzadas en la secuencia G1, S, G2 y mitosis. Por ello, en las células animales, dichos genes se consideran un subgrupo de los llamados (proto) oncogenes.

La importancia de la determinación de las bases moleculares de la proliferación celular en eucariotas ha sido reconocida con la con-

cesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2001 a Nurse, Hartwell y Hunt. Sus hallazgos demuestran la conservación del control de la proliferación por complejos CDK-ciclina durante 10⁹ años de evolución, el tiempo pasado desde que vivía la célula ancestral, ya dotada de esta herramienta molecular, de la que proceden las células de los eucariontes hoy presentes en la biosfera.

2. ACTIVACIÓN DE CDKS

2.1. Por acoplamiento a una ciclina

La asociación de la región PSTAIRE de la CDK tiene lugar con la llamada «caja» de la ciclina concreta que regula la transición entre fases a que se enfrenta la célula (Fig. 2).

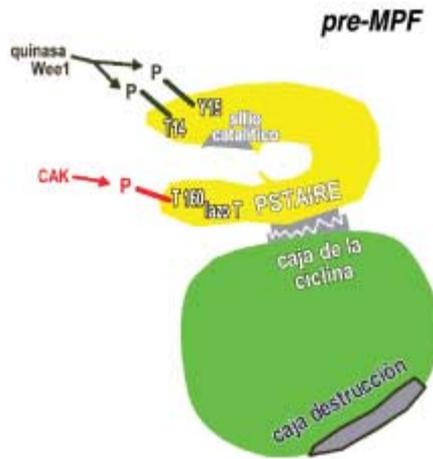


FIGURA 2. Esquema de los rasgos distintivos del pre-MPF o heterodímero CDK-ciclina mitótica, previo a su activación. La ciclina se ha asociado con la quinasa a través de la llamada caja de la ciclina. La ciclina también posee una zona, llamada caja de destrucción, que asegura su proteólisis, previa su marcado con una cola de poli-ubiquitina a cargo de la ligasa E3 conocida como ciclosoma. El heterodímero mostrado en esta figura ya está parcialmente activado por la fosforilación (a cargo de la CAK o quinasa que activa otras CDKs), que abre la hendidura catalítica de forma que el ATP puede ya penetrar en el bolso situado al final, próxima al sitio catalítico. La quinasa Wee1 mantiene fosforilados los residuos T14/Y15, cuya defosforilación activará de forma inmediata dicha quinasa, transformando a este dímero en MPF si la ciclina es una de las mitóticas.

Las ciclinas integran el control transcripcional en la progresión del ciclo. Ello se debe, por un lado, a que su síntesis tiene lugar en un momento concreto del ciclo proliferativo y, por otro, a su labilidad. Ésta viene asegurada por el marcado de una lisina en la «caja de destrucción» de la ciclina con una cola de poliubiquitina (un polipéptido de 76 aminoácidos presente en todas las células eucarióticas). Dicha cola sirve de llave para su entrada en el proteasoma, un complejo proteico en cuyo interior quedan expuestas a distintas proteasas. La degradación de las ciclinas es la responsable de la irreversibilidad de las transiciones entre fases que caracteriza al ciclo proliferativo.

La importancia del descubrimiento del proteasoma y su funcionamiento ha sido también objeto de reconocimiento con la concesión en 1988 del Premio Nobel de Química a Huber, Deisenhofer y Michet y, en 2004, el de Fisiología y Medicina a Ciechanover, Hershko y Rose. Estos últimos definieron los pasos intermedios, dependientes de la cadena enzimática de ubiquitín-ligasas E1, E2 y E3. Tanto la E3 conocida como SCF, que es constitutiva, y la llamada APC/ciclosoma (*Anaphase-Promoting Complex*) que es activa en la tardía mitosis, seleccionan proteínas degradables relacionadas con ciclo celular y con la reversión del estado mitótico, respectivamente.

2.2. CAKs, las quinasas activadoras de CDKs

La fosforilación de la treonina en la posición 160 o próxima en el lazo T de la quinasa activa la CDK unas 300 veces por encima de la actividad que presenta cuando este residuo permanece sin fosforilar. Dicho proceso corre a cargo de las llamadas CAKs (*CDK-Activating Kinases*), mientras que la fosfatasa PP2A la revierte. El complejo CDK-ciclina que tiene fosforilados dichos residuos, así como la treonina 14 y tirosina 15 en el lóbulo menor recibe el nombre de MPF cuando la ciclina es una de las mitóticas (Fig. 2).

Las CAKs triméricas están formadas por una CDK del llamado grupo D de las CDKs (homóloga a la CDK7 de mamíferos), la ciclina H y una proteína tipo RING (conocida como MAT1 en mamíferos) que se asocia a ácidos nucleicos y estabiliza interacciones proteína-proteína.

Dichas CAKs son capaces de fosforilar el dominio carboxi-terminal de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II, componente del factor de transcripción IIH, tanto en plantas como en animales. Por ello, también controlan el nivel de producción del mRNA total en la célula o, al menos, el de ciertos mensajeros específicos. La preferencia por fosforilar uno u otro sustrato varía en las distintas CAKs de plantas. Así, la CDKD;2, actúa preferentemente sobre la RNA polimerasa, mientras que la CDKD;3 lo hace sobre las CDKs. La primera CAK descrita en plantas, concretamente en arroz, fue conocida como R2 y es la más parecida a la ciclina D;2 de *Arabidopsis* (6).

2.3. Una CAK excepcional en plantas

Existe un segundo tipo de CAK en plantas que es activa como monómero. Se conoce como CDK tipo F. Su peculiaridad reside en que es ortóloga de la presente en levaduras (2). La presencia de esta CAK en plantas apoya la transferencia de genes de levaduras al linaje de las plantas en una endosimbiosis ocasional que se postula como uno de los motores de la evolución (4). La presencia en la célula vegetal de un grupo entero de ciclinas (las P) con homología también con las de levaduras (5) corrobora dicha transferencia.

Existe un único gen para esta CDKF en *Arabidopsis* y la quinasa codificada por ella sólo fosforila CDKs. Otro rasgo llamativo de esta CAK monomérica es su mayor eficacia cuando la CDK sustrato se halla también libre, como monómero. Comparte con las CAKs de levaduras su insensibilidad a un inhibidor general de quinasas (la 5'fluorosulfonilbenzoiladenosina) y su tolerancia a cambios en un residuo de lisina presente en la hendidura enzimática de las quinasas que resulta crítico para la correcta asociación del ATP a la quinasa (6).

3. INACTIVACIÓN DE COMPLEJOS CDK-CICLINAS

3.1. Por fosforilación

La fosforilación de la treonina 14 (T14) y la tirosina 15 (Y15) por la quinasa Wee1 mantiene a la CDK ya preparada, dentro ya del

núcleo de la célula pero aún inactiva, porque dicha fosforilación impide la entrada del ATP al bolso de la quinasa, situado al fondo de la hendidura catalítica de la CDK. La acción de la fosfatasa Cdc25 activa de forma instantánea el pre-MPF para dar lugar al MPF plenamente funcional (Fig. 3).

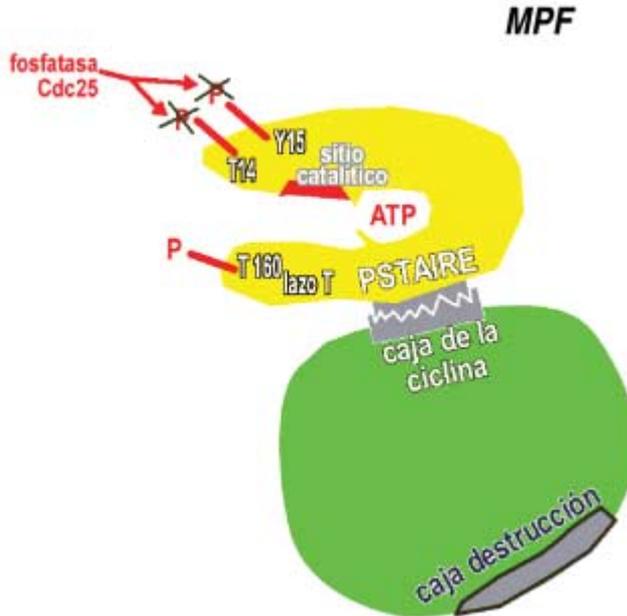


FIGURA 3. El MPF o inductor de condensación cromosómica mitótica. Si comparamos a este dímero con el de la Fig. anterior, vemos cómo se ha producido la defosforilación de los residuos T14/Y15 mediada por la fosfatasa Cdc25, lo que ha permitido el acople de la molécula de ATP en el bolso existente al final de la hendidura catalítica, permitiendo su plena activación como quinasa.

Aunque no existe un homólogo estructural de la fosfatasa Cdc25 en *Arabidopsis* (7, 8), sí existe en ellas una actividad fosfatásica semejante que la activa, por ejemplo, en respuesta a citoquinina (9). Puede ser que la secuencia primaria del homólogo funcional de la quinasa animal esté apenas conservada en plantas, aunque sí se conserven niveles de empaquetamiento o estereología de regiones críticas para su actividad.

3.2. Inactivación de CDKs por su asociación con inhibidores

Existen siete genes codificando por inhibidores de los complejos CDK-ciclina en *Arabidopsis thaliana* (10), todos ellos perteneciendo al grupo conocido como Cip/Kip de inhibidores de CDKs de mamíferos, por lo que se les ha denominado KRPs (*Kip-Related proteins*). No existen, en plantas, homólogos del inhibidor p21, el más universal de todos los CKIs en animales, cuya inducción corre a cargo del factor de transcripción p53. Ésta es una proteína de chequeo o supresora tumoral que controla la iniciación de la proliferación celular o transición G0/G1, aunque también participa en el control de la entrada en mitosis en mamíferos. No existen tampoco en plantas homólogos de la familia INK4 de inhibidores de CDKs que controlan la transición de dormancia a proliferación en animales.

Mientras que la activación del complejo CDK-ciclina producida por defosforilación de T14 e Y15 es rápida y su inhibición relativamente inestable, la inhibición de CDKs por inhibidores depende de la inducción de su previa transcripción. Por ello, esta respuesta es lenta aunque, en plantas, la represión de la actividad del complejo CDK-ciclina por KRPs puede ser más rápida que la que se produce por la ruta análoga en animales. Ello se debe a que en plantas existen KRPs inmovilizados que pueden ser rápidamente liberados cuando se requiera. El estado de quiescencia que se produce por esta vía es prácticamente permanente, a diferencia de los frenados que se producen por la vía de rutas de chequeo que veremos más adelante.

4. LAS CDKS DE PLANTAS

Existen más de 50 CDKs diferentes en plantas, agrupadas en seis grupos (Tabla 1). Su presencia en el ciclo viene señalada en la Fig. 4.

4.1. CDKs tipo A

En *Arabidopsis* existe un solo gen para la CDK tipo A. La quinasa contiene la secuencia canónica PSTAIRE y controla varias de las transiciones del ciclo celular, incluyendo la de iniciación de proliferación (G0 a G1) (11). En realidad, su presencia es un marcador selectivo de

proliferación, ya que esta quinasa no está presente en células durmientes. Existen variantes de la CDKA, con actividades diferenciales a lo largo del ciclo celular (12, 13) y, si bien la propia CDKA es constitutiva, su actividad en el ciclo celular se incrementa en G1 y G2.

Durante la activación de proliferación, CDKA se asocia a las ciclinas D1;1 y D1;3 y fosforila *in vitro* la proteína RB (retinoblastoma) que controla la transición G0 a G1. Aunque la ausencia de esta proteína produce un raro tumor de retina en niños, RB se encuentra también y tiene una función análoga en plantas (13). El heterodímero CDKA-ciclina D se une al factor de procesividad de la DNA polimerasa δ conocido como PCNA (14). Su liberación deja vía libre a la participación de PCNA en la replicación.

TABLA 1. CDKs de *Arabidopsis thaliana* (7, 8, 11)*

	<i>tipo</i>	<i>número</i>	<i>Características</i>
CDKs	A	1	a) constitutiva, pero actividad en G1 y G2 (11) b) PSTAIRE, ortóloga de CDK1 y 2 humanas c) G0/G1: fosforila y libera RB (13) y se disocia de PCNA (14)
	B	4	a) síntesis <u>bajo control transcripcional</u> en G2 (11, 12) b) dos subgrupos: B1 (PPTALRE) y B2 (PPTLRE)
	C	2	a) regula transcripción (15) b) PITAIRE ~ CDK9 humana (aunque esta PITALRE) c) actividad en G1/S
	D	3 (2-4)	a) CAKs triméricas (2, 3) b) ortóloga CDK7 humana c) fosforila CDKs y RNA pol II d) la D;2 regula replicación
	E	1	a) en alfalfa, no en <i>Arabidopsis</i> b) SPTAIRE
	F	1	a) CAK monomérica b) ortóloga de la de levaduras (6) c) sólo fosforila CDKs

(*) Los números entre paréntesis corresponden a referencias bibliográficas.

TABLA 2. *Ciclinas y otras subunidades de CDKs en plantas (8)**

	<i>tipo</i>	<i>número</i>	<i>características</i>	<i>subtipos</i>
Ciclinas	A	10	a) presentes en S y G2 (16) b) NLS alrededor de la «caja» c) no se degradan en anafase	A1 - A3
	B	9	a) Síntesis en G2 por elemento Myb en sus promotores (17) b) B1 en condensación cromosómica y ciclo microtubular (18) c) La degradación de B2 en la media profase coincide con inicio de la parte irreversible de mitosis (19)	B1 - B3
	D	10	a) ciclinas G1 (23), aunque la D3;1 también en G2 b) G0/G1: interacción con RB c) labilidad por secuencias PEST	D1-D7
	H	7	a) se ensambla con CAKs triméricas, es decir, con CDKs tipo D (2)	
	P	7	a) Ortólogas de la ciclina PHO80 de levaduras que controla G0/G1	
	T		a) Se asocian a CDKC para activar RNA pol II (15)	
Otras subunidades de CDKs	CKS	2	a) acoplan otras moléculas a CDKs, ampliando así sus sustratos b) esenciales para proliferación en plantas (24)	
	KRP	7	a) inhibidores de CDKs (10) b) ortólogos de p27Kip1 humana c) KRP1 y 2 en endorreduplicación	

(*) Los números entre paréntesis corresponden a referencias bibliográficas.

4.2. CDKs tipo B o mitóticas

Existen, además, dos grupos de CDK tipo B o mitóticas, específicas de plantas (Tabla 1 y la mitad superior de la Fig. 4). Las siete CDKBs presentes en *Arabidopsis thaliana* se agrupan en dos

subclases: CDK tipo B1 (cuyo motivo es PPTALRE) y CDK tipo B2 (PPTTLRE) (11), previamente descritas en alfalfa como D y F, respectivamente (12). Su presencia en el ciclo viene señalada en la Figura 4.

Es llamativo, por lo excepcional, que la síntesis de las CDKs tipo B esté restringida a G2 y a la temprana mitosis, porque ello significa que estas CDKs están reguladas a nivel de transcripción, un nivel al que, en levaduras y células animales, sólo están sujetas las ciclinas.

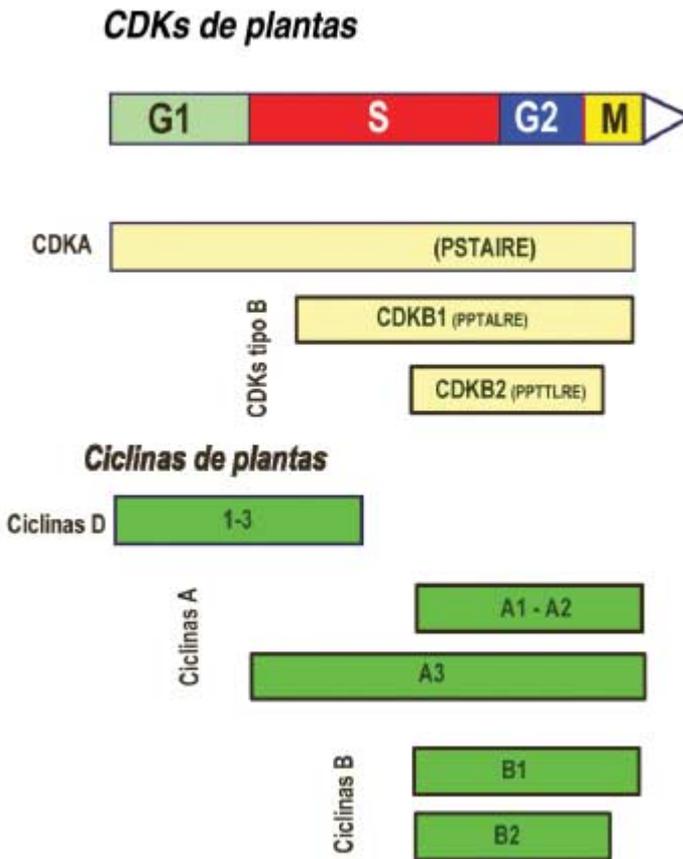


FIGURA 4. Presencia de las distintas CDKs y de los distintos subtipos de ciclinas responsables de la progresión del ciclo celular en plantas. En las CDKs, entre paréntesis, las secuencias responsables de su ensamblaje con ciclinas.

4.3. CDKs no específicas del ciclo proliferativo

En primer lugar están las que activan CDKs, es decir, las llamadas CAKs (Tabla 1), que han sido comentadas más arriba.

Aparte de las CAKS, existe en plantas una quinasa conocida como CDK tipo C que posee PITAIRE como motivo de interacción con ciclinas y está implicada en la regulación de transcripción (15). Se considera homóloga funcional de la CDK9 humana, aunque ésta posee una secuencia distinta (PITALRE).

5. LAS CICLINAS DE PLANTAS

En plantas existen más de 60 ciclinas pertenecientes a siete tipos diferentes. Muchas, pero no todas, son responsables de la culminación de las distintas transiciones entre distintas fases consecutivas del ciclo proliferativo (Tabla 2). Su presencia en el ciclo celular de plantas está recogida en la Figura 4, debajo de los datos referentes a las CDKs, con las que han de interaccionar para activarlas.

5.1. Ciclinas tipo A

Existen 10 ciclinas tipo A en *Arabidopsis*, agrupables en tres subtipos (A1-3). Dos pertenecen al subtipo A1, mientras que los subtipos 2 y 3 poseen cuatro ciclinas cada uno (16).

Las ciclinas A3 son las que poseen un dominio N-terminal más corto y las que se expresan más temprano en el ciclo celular, en la transición G1 a S. Mientras que en tabaco la ciclina A3,2 pudiera estar relacionada con la iniciación de la replicación, la ciclina A3,1 podría controlar la elongación de las cadenas nacientes (Fig. 4). Por otra parte, las ciclinas tipo A1 y A2 comienzan su actividad hacia la mitad del periodo S (8, 12), y aunque podrían controlar el encendido de orígenes tardíos de replicación, lo probado es que controlan G2 y la iniciación de la mitosis. Por último, estas dos últimas ciclinas sólo se asocian *in vitro* con la subunidad catalítica CDKA (16).

5.2. Las ciclinas tipo B o mitóticas

Este grupo de ciclinas consta de nueve miembros en *Arabidopsis*. Existen dos subtipos principales: B1 y B2, con cuatro miembros cada una y otra ciclina para la que se ha propuesto crear una nueva subclase, la B3, en base a sus diferencias en estructura primaria con las anteriores (7). Las ciclinas mitóticas hacen su aparición entre finales del S y G2 (Fig. 4). La activación de la transcripción de las ciclinas B de plantas está basada en el reconocimiento, por factores de transcripción que recuerdan a los Myb de animales, de un motivo consenso formado por 9 pares de bases, conocido como MSA (*Mitosis-Specific Activator*). Esta secuencia está también presente en alguna otra proteína mitótica como, por ejemplo, en las quinesinas (17). Ello puede explicar la coordinación de la transcripción de proteínas de las que depende la iniciación de la mitosis en la célula vegetal.

En cuanto a las ciclinas B1, existen cuatro diferentes. Al menos la expresión de la ciclina B1;2, aunque no la de la B1;1, es un potente inductor de la transición G2-mitosis en el ciclo celular. Así, la expresión ectópica de ciclina B1;2 permite que los tricomas foliares mantengan un ciclo proliferativo convencional, con sus células diploides, en lugar de llevar a cabo ciclos abreviados, sin mitosis, que les hace llegar a ser politénicas por el proceso conocido como endoreduplicación.

Las ciclinas B1 parecen tener un papel clave en el ciclo microtubular responsable de la división citoplásmica que es específica de plantas. Así, esta ciclina se localiza en la banda preprofásica microtubular además de encontrarse en la envoltura nuclear, antes de su rotura en prometafase, y en los cromosomas mitóticos condensados (18). La expresión ectópica de la ciclina B1 adelanta la desaparición de la banda preprofásica de microtúbulos que marca el comienzo de la profase. Además, el bloqueo de la degradación de toda la ciclina B1 presente en la célula, como consecuencia de una mutación en su «caja de destrucción», impide la formación del fragmoplasto (18). Ello induce una alteración en la mitosis, conocida como endomitosis, en las que las cromátidas hermanas acaban de segregarse por sus centrómeros dando lugar a cromosomas hijos que se mantienen dentro de un mismo núcleo, duplicándose su número. El contenido en la ciclina B1 sigue incrementándose hasta metafase, y

las células acumuladas en metafase presentan su contenido alto de ciclina B1 (18).

En cuanto a las ciclinas que pertenecen al grupo B2, nuestro grupo, en colaboración con otros dos también europeos (el del profesor Heberle-Bors del Biozentrum de la Universidad de Viena y el del doctor Bögre del Royal Holloway, de la Universidad de Londres), ha estudiado la función de la ciclina B2; 2 en la transición G2-profase (19).

La expresión ectópica de ciclina B2;2 adelanta la entrada en mitosis, definida como iniciación de condensación cromosómica. De forma análoga a lo que ocurre con la ciclina B1, la carencia de ciclina B2 impide la transición de G2 a mitosis (65; 85). Los contenidos, pues, en ciclinas B1 y B2 actúan en la célula vegetal como factores limitantes para la entrada en mitosis, como corresponde a su papel como reguladores positivos de G2.

La ciclina B2;2 de la célula se comporta siempre como una proteína intranuclear. El seguimiento de una construcción ciclina B2;2-proteína verde fluorescente demostró que esta ciclina es estable a partir de un cierto momento en G1 y así se mantiene durante S y G2. Su degradación tiene lugar en profase, mientras que su expresión ectópica durante metafase interfiere con el alineamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial (19). Su expresión ectópica también adelanta la entrada en mitosis en células en las que se ha activado la ruta de chequeo G2 por inhibición de la topoisomerasa II, impidiendo la resolución de catenaciones producidas durante la individualización cromosómica premitótica (20).

En la profase temprana de todas las células eucarióticas ocurre un fenómeno único en el ciclo celular: la condensación cromosómica que se observa en la media profase puede revertirse hasta el nivel observado en interfase tanto en mamíferos (21) como en plantas, en éstas concretamente cuando se inhibe la síntesis simultánea de proteínas (22). La presencia en la profase media de la ciclina B2 en la célula vegetal y de su homólogo funcional, la ciclina A, en animales puede ser responsable de dicha reversibilidad. Una vez que estas ciclinas desaparecen, las profases están comprometidas de forma irreversible, a continuar la profase y metafase.

5.3. Ciclinas tipo D

Las ciclinas tipo D son ortólogas de las tipo D de mamíferos y, como ellas, son intermediarios a través de los cuales se ejerce el control social de la proliferación en una célula en la transición entre dormancia y proliferación. Son ciclinas que están presentes en G1. Existen 10 ciclinas D, pertenecientes a siete subtipos (D1-D7) (7, 23). Una característica que las ciclinas D de plantas que tienen en común con las G1 de levaduras es la presencia de secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina) que las hace ser dianas de enzimas proteolíticas. La degradación de las ciclinas D ocurre en el proteasoma, previo su marcado con poli-ubiquitina, mediado por la ubiquitín ligasa E3 conocida como SCF, que es de presencia constitutiva en el ciclo celular.

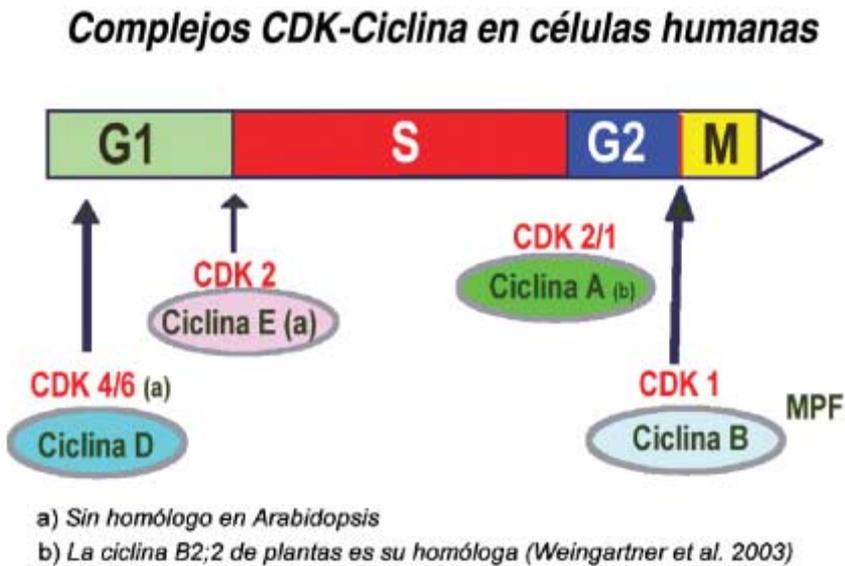


FIGURA 5. Heterodímeros CDK-ciclina en relación a las distintas transiciones del ciclo celular en células humanas. De alguna de las CDKs y ciclinas no existen homólogos en plantas.

Las ciclinas D activan específicamente la subunidad catalítica de la CDK tipo A, con la que se ensamblan.

Uno de los rasgos de las ciclinas D, que comparten con las humanas, es que casi todas (la D4;2 y 6 y, parcialmente, la D5;1 son excepciones) poseen en su región amino-terminal la secuencia LXCXE (donde X es cualquier aminoácido esencial; L, C y E corresponden a leucina, cisteína y ácido glutámico, respectivamente) que las permite asociarse al homólogo que poseen las plantas de la proteína RB (retinoblastoma) (13).

En las células animales se conocen los heterodímeros CDK-ciclina correspondiente a cada transición del ciclo celular. Ellas aparecen en la Figura 5.

Aunque no existe un conocimiento preciso de las subunidades que forman los heterodímeros correspondientes en plantas, la Figura 6 recoge lo que se conoce y lo que se puede deducir de la presencia de ambas subunidades de la CDK activa en las células vegetales.

Complejos CDK-Ciclina en células de plantas

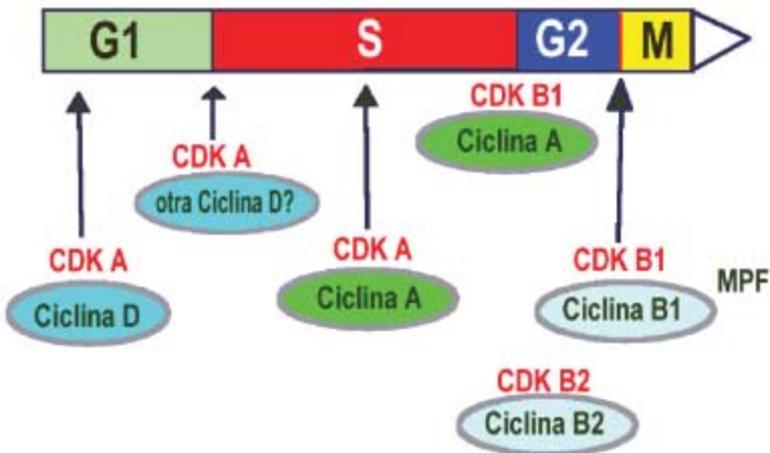


FIGURA 6. Presencia de las distintos heterodímeros CDK-ciclinas en el ciclo celular de células vegetales. Estas células carecen de un homólogo de la ciclina E humana que opera en la iniciación de proliferación (comienzo del periodo S). Se postula que la oscilación entre las distintas ciclinas D o el cambio de una a otra puede hacer ese papel en la célula de plantas. La especial complejidad del control de G2 y temprana mitosis en plantas queda de manifiesto por la existencia de tres heterodímeros distintos. La CDK2-ciclina B2 es el homólogo funcional del CCDK1/2-ciclina A humano. No se sabe bien si la asociación de CDKB1 a ciclina A o a ciclina B1 solapan en el tiempo u ocurren en secuencia.

5.4. Ciclinas de plantas no relacionadas directamente con el ciclo

Además de las ciclinas con función directa sobre la aceleración del ciclo celular en distintas regiones del ciclo celular en plantas, en ellas existe —como en animales— la ciclina H (Tabla 2) que interacciona con las CAK tipo D (2, 3) (Tabla 1).

En plantas, además, existen otras ciclinas como las T que se unen a la CDKC y actúan en el control de la transcripción (15) y las siete ciclinas tipo P, recientemente descritas en *Arabidopsis*, que interaccionan con la CDKA;1 pero que se expresan también en tejidos en diferenciación y maduros. Estas ciclinas comparten una región central de 100 aminoácidos de su «caja de ciclina» con la presente en ciclinas G1 de Tripanosomas y en la ciclina PHO80 de *S. cerevisiae* (5). De nuevo, estas ciclinas P refuerzan la teoría de la transferencia de paquetes de genes de levaduras al genoma de plantas, relacionada con una simbiosis ocasional, semejante a la descrita por incorporación del genoma de bacterias a otros genomas eucarióticos y que sería una vía de evolución para éstos últimos, según una propuesta muy a tener en cuenta (4).

6. OTRAS SUBUNIDADES DE LOS COMPLEJOS CDK-CICLINAS

Existe una subunidad de los complejos CDK-ciclina conocida como CKS (*Cdk Subunit*) que presenta tal afinidad por la CDK que se usa como cebo en las columnas que permiten el aislamiento de la subunidad catalítica de las CDKs. Se cree que sirve como adaptadora de sustratos potenciales de las quinasas dependientes de ciclina y de otras posibles proteínas reguladoras.

Se han descrito dos CKSs (1 y 2) en *Arabidopsis* (Tabla 2). Ambas carecen de los extremos amino y carboxi terminal que caracterizan a las CKSs de levaduras. Hoy se sabe que estas subunidades son esenciales para la proliferación celular en plantas (24).

Finalmente, la célula vegetal cuenta también con los inhibidores fisiológicos de CDKs conocidos como KRP (*Kip-Related Proteins*),

arriba comentados (10) cuya asociación con los dímeros CDK-ciclina, los inactiva.

La expresión del ortólogo p27, en células humanas, tiene la peculiaridad de ser activada por la señal antimitogénica producida por TGF- β (*Transcription Growth Factor* β), pero no por la proteína supresora tumoral p53, lo que es compatible con la eficacia de p27 (Kip1) en el entorno libre de p53 que caracteriza a las células de plantas (25).

Dos de los siete KRPs, concretamente el 1 y 2, se encuentran en tejidos en los que se produce endorreduplicación, como ocurre en los tricomas que se desarrollan en las hojas de *Arabidopsis*.

7. LAS RUTAS DE CHEQUEO, MECANISMOS QUE FRENAN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

El grupo de Hartwell, trabajando en *S. cerevisiae*, da un paso decisivo en la comprensión del ciclo celular al descubrir que la carencia de un gen, el llamado RAD9, en lugar de interrumpir la progresión de la célula hacia etapas más tardías del ciclo celular, permite la entrada anticipada en etapas posteriores del ciclo antes de que su ADN esté totalmente replicado y reparado o, lo que es lo mismo, antes que la célula se encuentra debidamente preparada para su entrada en mitosis (26).

El gen RAD9 es cabeza de serie de unos reguladores de ciclo que fueron bautizados como genes de chequeo y, también, genes de control por retroalimentación. En células humanas forman un subgrupo de los llamados supresores tumorales, que incluyen otros genes que activan un programa de suicidio celular o apoptosis. Todos ellos evitan la propagación de células con información genética deteriorada.

Los genes de chequeo que frenan la progresión del ciclo son reguladores negativos de la proliferación. Son genes recesivos. Su actividad sólo se interrumpe en las células somáticas diploides cuando faltan o son disfuncionales las dos copias situadas en el par de cromosomas homólogos.

Existen, al menos, seis regiones del ciclo donde operan los genes de chequeo comprobando la idoneidad de una célula para afrontar una transición irreversible a una fase posterior del ciclo, frenándola si la célula carece de algún requisito imprescindible (Fig. 7). Dos de estas regiones —la situada al principio del G1 y la situada en G2—, permiten la entrada y la salida del ciclo, respectivamente, cuando las condiciones valoradas por las correspondientes rutas de chequeo así lo aconsejan.

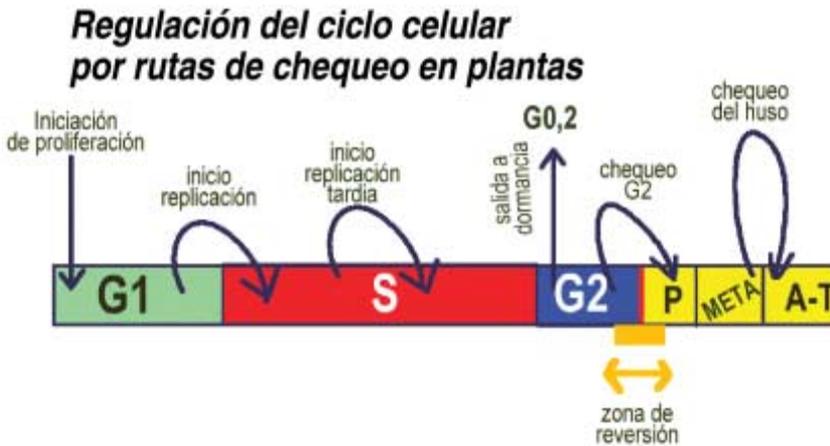


FIGURA 7. Distintas rutas de chequeo en el ciclo celular de plantas. Las flecha al principio de G1 y G2 señalan la iniciación de proliferación y la salida a dormancia guardadas por las correspondientes rutas de chequeo que responden tanto a señales intracelulares como a las extracelulares. Las señales de idoneidad intracelulares son por tanto específicas para una célula concreta frente una transición irreversible específica entre fases consecutivas del ciclo. También se señalan esta figura la zona de reversión situada entre el tardío G2 y la primera parte de la profase, en respuesta a condiciones ambientales o internas desfavorables para llevar a cabo meta- y anafase. La reversibilidad de la profase parece desaparecer con la degradación de la ciclina B2;2 en plantas y con la ciclina A en humanos.

Es una observación normal que idénticas rutas de chequeo posean distintos niveles de restricción en diferentes especies, dependiendo del entorno genómico de dichos genes de chequeo. Así, la región de chequeo G2 es la más estricta de todas en plantas y *S. pombe* mientras que, por el contrario, en mamíferos y *S. cerevisiae* el control más estricto es el responsable de la iniciación de proliferación.

8. FUNCIONES Y BASES MOLECULARES DE LAS RUTAS DE CHEQUEO

Las posibilidades de modulación de la CDK permiten hacerse una idea de cómo la célula puede conseguir frenar el reloj de la proliferación basado en CDK-ciclinas (27).

Los genes de chequeo permiten a la célula responder al control social o juego de señales de carácter mitogénico o antimitogénico producidas por otras células del mismo tejido o por otros tejidos sobre la conveniencia o no de iniciar —o en su caso continuar— el ciclo de división. Este tipo de chequeo se suele ejercer en la transición G0 a G1, a través de la llamada ruta del retinoblastoma (Fig. 8) aunque en plantas la entrada a ciclo se lleva a cabo también entre G0,2 y G2.

Los genes de chequeo que actúan dentro ya del ciclo celular lo hacen en respuesta a un sistema de retroalimentación que les permite conocer, a nivel de cada célula individual, su adecuación para llevar a cabo una transición entre fases. La región del ciclo en la que una célula interrumpe su progresión al fallar la función de un gen regulador positivo se llama punto de control. Por el contrario, la región en la que se frena la progresión hacia una fase posterior del ciclo celular se llama punto de chequeo.

Si la interrupción del ciclo celular se debe a la carencia de un regulador positivo la parada que se produce en el ciclo es permanente. Por el contrario, si dicha parada se debe a la actividad de un regulador negativo del ciclo proliferativo es sólo transitoria. La disfunción de una proteína represora, de chequeo, permite —después de un tiempo— la entrada de la célula a la fase siguiente del ciclo celular cuando aún no se encuentra preparada para culminar con éxito los procesos que habrá de llevar a cabo en la fase siguiente (26). Este proceso se conoce como «adaptación» a rutas de chequeo.

Adaptación a chequeo es un término aceptado, pero que resulta equívoco. Este mecanismo lo que realmente permite es realizar una transición irreversible a una fase posterior del ciclo sin que la célula esté preparada. Un paradigma de este proceso viene dado por la entrada en mitosis de células con ADN sólo parcialmente replicado o ya replicado pero con daño no reparado. La consecuencia de la adaptación a chequeo, en este caso, dará lugar a lo que se conoce

como mitosis prematura, en el sentido de que tiene lugar antes de que el ADN de la célula esté preparado. Siguiendo con este ejemplo concreto, la tensión anafásica de los cinetocoros migrando hacia polos opuestos del huso y la segregación de las cromátidas hermanas producirá la aparición de roturas en los brazos cromosómicos que originarán aneuploidías, por pérdida de fragmentos cromosómicos acéntricos.

Las rutas de chequeo son las responsables de mantener invariable la secuencia de las fases del ciclo proliferativo. Están formadas por cadenas enzimáticas de transmisión de señales. Constan, en primer lugar, de una proteína sensora que valora el estado de componentes internos de la célula o de señales extracelulares sobre lo adecuado de iniciar o continuar proliferación.

Para cada ruta de chequeo existen al menos dos dianas distintas. La primera activa el proceso que falta por completar a la célula para enfrentarse sin riesgo a un salto de fase. La segunda diana es el propio complejo CDK-ciclina que controla la transición específica de la célula a la etapa siguiente del ciclo, en este caso para frenar su activación (27) y con ello retrasar en el tiempo la transición de riesgo que debe evitarse. Éste es un mecanismo post-transcripcional, independiente de la iniciación de transcripción de nuevas proteínas en la célula.

Las cadenas de transducción de señales en humanos son dos. La primera se inicia con la quinasa temprana ATM, mutada en el síndrome conocido como Ataxia-telangiectasia en el hombre, uno de los síndromes que conllevan inestabilidad genómica y, como consecuencia, alto riesgo de desarrollo de tumores. Un ortólogo de este gen está también presente en *Arabidopsis* (28). Esta cadena acaba en la quinasa efectora Chk2 (*Checkpoint Kinase 2*). La otra ruta de transducción de señales comienza en la quinasa ATR (*ATM and Rad3-Related kinase*) y acaba en la quinasa Chk1. La quinasa de esta segunda ruta también está presente en *Arabidopsis* (29).

En plantas, la quinasa ATM fosforila proteínas responsables de la reparación del ADN dañado y también otras que controlan el ciclo celular, mientras que la quinasa ATR parece ser la responsable de las rutas de chequeo que dentro del periodo S son capaces de frenarlo cuando existe una depleción en nucleótidos producida por un fallo en

la ribonucleótido-reductasa, así como del chequeo en G2 que se activa una vez que ha ocurrido la adaptación a los chequeos intra-S (29).

La célula vegetal también posee un homólogo de la molécula adaptadora BRCA1 (*Breast Cancer 1*) que se halla mutada en una parte de los cánceres de mama hereditarios. Esta molécula, en el hombre, sirve como plataforma de ensamblaje para complejos en los que intervienen varias de las proteínas de chequeo y las responsables de reparación en animales (30). Se supone que tiene un papel análogo en la célula vegetal.

Las rutas de chequeo comparten con las redes neuronales propiedades tales como la de ampliar una señal intracelular de riesgo hasta llegar a un nivel eficaz para que dicha señal pueda inducir la interrupción del ciclo. Se considera que esto es debido a la existencia de rutas redundantes. El fenómeno de adaptación a rutas de chequeo (apartado 11) tiene también su correlato en las redes neuronales, en las que señales que se producen de forma continua se comportan como si, pasado algún tiempo, dejaran de «ser oídas» por la célula. Las rutas de chequeo son también capaces de computar señales de signo diferentes, como puede ser el contenido de ciclina B2;2 y la existencia de daño no reparado en G2 para producir un resultado final único, de signo positivo (mitogénico) o negativo que permita o frene la entrada en mitosis, respectivamente (31).

9. LA DISPENSABILIDAD DE LAS RUTAS DE CHEQUEO

Como se puede suponer, en el caso de que no exista ningún tipo de daño intracelular o riesgo, la presencia o no de rutas de chequeo en la célula es irrelevante. La carencia de rutas de chequeo en las primeras divisiones cigóticas se ha justificado por el hecho de que los genomas implicados en ellas acaban de pasar una prueba exhaustiva de corrección de errores en la meiosis inmediatamente anterior, durante recombinación entre los homólogos del bivalente.

Sin embargo, hemos hallado que la estimulación de proliferación en los primordios durmientes de la raíz presentes en el bulbo de cebolla no lleva a la inducción simultánea de las rutas de chequeo. No hay indicio alguno de la existencia de retraso en la aparición de las primeras mitosis producido en respuesta a radiación ionizante.

Esta carencia se confirma, además, por la mayor frecuencia de micronúcleos, testigos de la existencia de fragmentos acéntricos en mitosis previas (32). Se puede concluir que, ante condiciones fisiológicas adecuadas para iniciar proliferación en raíces durmientes, la activación rápida de rutas metabólicas básicas es prioritaria y más temprana que la implantación de las rutas de chequeo.

10. EL CHEQUEO DE LA INICIACIÓN DE PROLIFERACIÓN

A pesar del relativamente bajo nivel de restricción de la ruta de chequeo que controla la transición de G0 a G1 en relación a la que controla la transición de G2 a mitosis en plantas, la llamada ruta del retinoblastoma que controla esta importante decisión en las células animales, también opera en plantas.

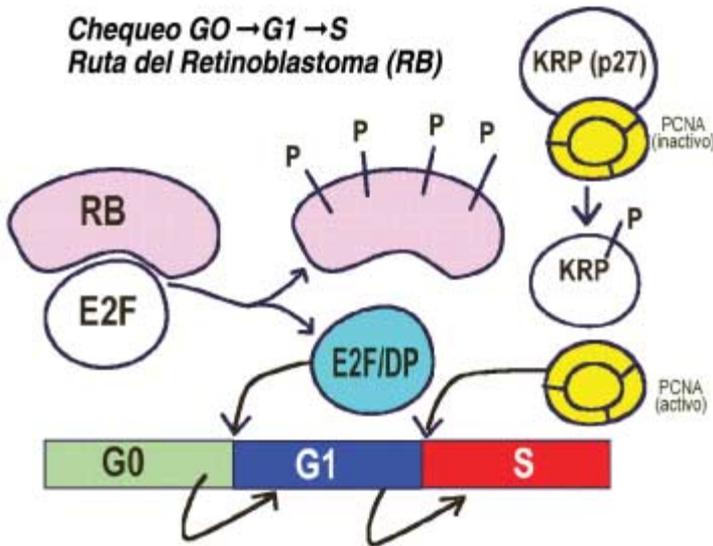


FIGURA 8. Chequeo de la entrada en proliferación o paso G0 a G1, así como de la iniciación de replicación (paso G1 a S). En G0 la proteína retinoblastoma (RB) mantiene secuestrado el factor de transcripción E2F. La fosforilación de RB libera al factor E2F que dimeriza y permite la transcripción de proteínas requeridas para iniciar replicación. Sin embargo, la entrada en S exige, además, la remoción de KRP, un inhibidor de las CDKs que mantiene secuestrado al PCNA o factor de procesividad de la DNA polimerasa δ .

El grupo del profesor Crisanto Gutiérrez, de la Universidad Autónoma de Madrid, ha jugado una parte muy importante en el descubrimiento del homólogo de la proteína retinoblastoma y de su papel en plantas (13), así como de la asociación «interesada» de geminivirus a ella, para así activar la proliferación de la célula para que les sirva de soporte.

La CDKA o subunidad catalítica de la quinasa constitutiva de plantas interviene en la iniciación de proliferación asociada al menos a la ciclina D2 (Fig. 8), aunque el ensamblaje de la CDKA con las ciclinas D1;1 y D1;3 también fosforila *in vitro* la proteína RB.

Como vemos en la misma Figura 8, la liberación del factor de transcripción E2F y su dimerización a cargo de DP (33) produce la activación de la transcripción de genes requeridos para la iniciación de replicación de ADN. Un segundo paso para permitir la replicación del ADN nuclear se produce al liberar al PCNA de su asociación a RB (14), así como la degradación de KRPs, el inhibidor de CDKs que es el homólogo en plantas del inhibidor de CDKs p27 (Kip1) humano (10). Con ello se pone en marcha la síntesis de proteínas responsables de la replicación en la célula vegetal y la propia replicación.

11. EL CHEQUEO DE LA ELONGACIÓN DEL DNA NACIENTE

Una vez iniciada la replicación del ADN, existen dos regiones de chequeo dentro del propio periodo S (Fig. 8), como ha mostrado nuestro grupo en *Allium cepa* al producir una falta de nucleótidos como consecuencia de la inhibición del enzima ribonucleótido-reductasa por hidroxiurea (34). Estas dos regiones de chequeo dentro del periodo S de las células vegetales coinciden con las etapas de elongación de las cadenas de ADN de nueva síntesis, producidas bien en orígenes tempranos o en los tardíos, respectivamente. Esencialmente, esto ocurre también de forma semejante a lo observado en las células de mamíferos (35).

12. EL CHEQUEO G2

Nuestro grupo ha centrado su interés en el chequeo que, durante el G2, frena la llegada a mitosis antes de que la célula vegetal se encuentre en condiciones adecuadas para dicha entrada. Se trata, pues, del control negativo de la entrada en mitosis (ver Fig. 6).

La ruta G2 integra el chequeo sobre un conjunto de circunstancias que se deben producir en la tardía interfase para que la entrada en mitosis sea segura. Dicha entrada es consecuencia de un balance final de carácter mitogénico después de la valoración de señales de distinto signo procedentes de las distintas subrutas que se integran en un mismo punto de chequeo.

12.1. Activación de la ruta de chequeo G2 por la presencia de DNA no replicado

La inducción de células multinucleadas en los meristemos es un sistema desarrollado por el grupo del profesor doctor Gonzalo Giménez Martín, miembro correspondiente de esta Real Academia, en su grupo de investigación en Madrid, al que debo mi formación y en el que he desarrollado la mayor parte de mi carrera investigadora. Las células multinucleadas ponen en evidencia que la entrada en mitosis depende de la terminación de la replicación en plantas. Así, aunque todos los núcleos de cada una de estas células inician su replicación simultáneamente, aquéllos con un mayor entorno citoplásmico terminan antes la replicación. Los primeros se pueden llamar núcleos rápidos en replicación, mientras que los últimos serían núcleos lentos (36). En estas células es posible, pues, inhibir selectivamente la replicación de los núcleos lentos una vez que los rápidos hayan completado la suya. Del estudio de la ruta de chequeo G2 en plantas se puede deducir que la presencia de núcleos lentos, aún en replicación, es capaz de frenar la entrada en mitosis de los núcleos que ya la han completado (37). Expresado de otra manera, esta condición activa la ruta de chequeo G2 y frena durante un cierto tiempo la transición a mitosis de los núcleos que comparten el mismo entorno citoplásmico y que ya habían completado su replicación. La adaptación a esta ruta de chequeo G2 se pone de manifiesto porque, des-

pués de un retraso, todos los núcleos de la célula acaban por entrar en mitosis, incluidos los lentos que, como aún no han completado su replicación, muestran roturas cromatídicas en sus cromosomas. Entre éstos últimos, mientras que algunos sufren la mera inducción de condensación cromosómica prematura, otros forman incluso su propio huso mitótico, aunque sólo los segmentos cromosómicos con cinetocoro se anclan a él y se segregan.

12.2. Activación de la ruta de chequeo G2 al inhibir la decatenación del DNA

La topoisomerasa II es una enzima que resuelve tanto las catenaciones que se producen entre las dos moléculas hermanas del DNA durante su replicación, como las no replicativas que se producen al azar entre moléculas próximas del DNA que se tocan de forma fortuita (20). El empleo de ICRF-193, un inhibidor que no produce de forma colateral roturas en las cadenas de ADN nos ha permitido determinar que el chequeo del estado de catenación se encuentra también integrado en la ruta G2. Dicha ruta de chequeo comprueba la individualización de los distintos cromosomas, consecuencia de la resolución de catenaciones no replicativas producidas durante la reestructuración de los dominios cromosómicos que tienen lugar en preparación para la mitosis.

12.3. La activación de la ruta de chequeo G2 por daño radioinducido en el DNA

La irradiación de meristemos, creciendo en equilibrio dinámico, con distintas dosis de rayos X ha permitido determinar que los alargamientos en la llegada a mitosis, inducidos por las rutas de chequeo de replicación y la de DNA en G2 son función lineal de la dosis de irradiación y, por tanto, del daño en su DNA. Sin embargo, incluso cuando la irradiación se produce a dosis que no afectan al crecimiento de la raíz, el tiempo que pasa hasta que se produce una nueva ola mitótica es siempre insuficiente para la reparación completa del daño presente en su ADN. Así, algunas mitosis de las que forman la ola tardía en relación al momento de irradiación presentan roturas cromatí-

dicas (38). Esta observación prueba que la entrada en mitosis se ha producido por adaptación a la ruta de chequeo G2.

13. EL CHEQUEO DEL HUSO

Existe al menos una transición dentro de la propia mitosis, la correspondiente a la iniciación de la anafase, que se encuentra bajo supervisión por la llamada ruta de chequeo del huso. Esta ruta, como se describió en células animales, condiciona el permiso a iniciar la segregación de centrómeros en anafase a que los centrómeros de todos los cromosomas se encuentran asociados mediante microtúbulos a ambos polos del huso (39).

Nuestro grupo ha demostrado que, en plantas, la ruta de chequeo del huso, aparte de valorar el anclaje de los centrómeros de todos y cada uno de los cromosomas a ambos polos del huso mitótico, también comprueba si todavía persiste alguna catenación replicativa residual entre las cromátidas hermanas, bien a nivel de los brazos cromosómicos o de sus centrómeros.

14. LA INESTABILIDAD GENÓMICA

La existencia de un paquete de células incapaces de completar su reparación, incluso a dosis de irradiación que no disminuyen la velocidad de crecimiento de la raíz (38) fue una sorpresa. Contradice la firme creencia de que las rutas de chequeo sirven para evitar la aparición de inestabilidad genómica cuando, en realidad, la célula que presenta en G2 daño remanente en su ADN, aunque éste no supere su capacidad reparativa, favorece la iniciación de un experimento en microevolución. La célula se comporta como si su objetivo no fuera agotar toda su capacidad de reparación antes de que ocurra la transición por adaptación a chequeo. En lugar de ello, la célula parece favorecer la posibilidad de ensayar re-estructuraciones de su genoma, a costa de la adquisición de inestabilidad genómica.

La introducción de una sola rotura bicatenaria de DNA en la célula post-mitótica, al principio de su nuevo ciclo, asegura la inestabilidad genómica en las células que clonalmente se van a derivar

de ella, ya que reestructuraciones genómicas inestables, seguidas de saltos indebidos por transiciones del ciclo, hacen evolucionar a la célula hacia un fenotipo mutador, en el que se llegan a acumular múltiples mutaciones.

La inducción de inestabilidad genómica por roturas bicatenarias no reparadas se basa en que la recombinación homóloga tiene lugar con una frecuencia unas 100 veces mayor con las secuencias intactas presentes en la cromátida hermana que con las presentes en el cromosoma homólogo, como consecuencia de su confinamiento en dominios no adyacentes del núcleo. De ello se deduce que la recombinación reparativa en G1 tiene lugar preferentemente por recombinación no homóloga, tolerada en la célula porque algo menos del 5 por 100 del genoma son genes que se expresan. Pero la reparación no homóloga suele dar lugar a cromosomas dicéntricos. Éstos, a su vez, dan lugar a puentes cromosómicos en la siguiente anafase, que sólo se resolverán con la producción de una nueva rotura al azar, algunas veces producida mecánicamente por la placa de citocinesis en formación, actuando como una cizalla sobre un puente cromosómico. Rotura bicatenaria en núcleo G1-reparación por recombinación no homóloga-producción de cromosoma dicéntrico-puente cromosómico en la anafase siguiente-rotura del puente cromosómico en telofase-entrada del núcleo en G1 con otras roturas bicatenarias ocurridas al azar, cierran un círculo que perpetúa la inestabilidad genómica en las células clonalmente derivadas de la primera.

15. LA CANCELACIÓN DE RUTAS DE CHEQUEO POR ANÁLOGOS DE PURINAS

La inhibición selectiva que cafeína y otros análogos de las purinas canónicas del ADN ejercen sobre las quinasas que inician las rutas de chequeo (ATM/ATR) explica, por un lado, la minimización o parcial cancelación de las paradas que estas rutas inducen en la duración del G2 en presencia de daño en el ADN (34). Por otra parte, y como consecuencia de lo anterior, los análogos de bases presentes en el ADN «potencian» las roturas cromosómicas observadas en mitosis cuando se usan en G2 en combinación o después del uso de un agente clastogénico.

Ahora bien, los análogos de purinas no sólo podían ser canceladores universales de rutas de chequeo sino que podían inducir un proceso más radical, saltando indebidamente a una etapa posterior no necesariamente la subsiguiente, como por ejemplo saltar de G1 o del periodo S a mitosis (40). Ese salto excesivo a una fase no adyacente se produce en una línea celular humana en la que la expresión de la ciclina mitótica (que normalmente empieza a expresarse en G2) se adelanta al periodo G1 o S (40).

Nuestro grupo utilizó meristemos de *Allium cepa* L., creciendo en condiciones de equilibrio dinámico, para determinar cómo era la respuesta de la célula vegetal a cafeína. En primer lugar se vio que las células previamente retenidas por rutas de chequeo de replicación, en S temprano y, después, en S medio y que habían saltado indebidamente ambos bloqueos, llegan a G2 con contenidos de DNA por debajo del contenido $2n4C$ que caracteriza a las células G2. Más aún, muchas de estas células alcanzan, después de un largo G2, la mitosis, pero con cromosomas fragmentados. Estos datos señalan que en los meristemos de plantas con las rutas de chequeo intactas, el salto indebido de un bloqueo por chequeo no libra a las células vegetales de ser nuevamente retenidas en el siguiente punto del ciclo, donde se produce un nuevo chequeo de idoneidad. Pero en cualquier caso, la cafeína no induce a las células retenidas por chequeo dentro del periodo S saltar de forma directa hasta mitosis.

Más tarde, usando plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* pudimos demostrar que era necesaria la inducción simultánea de la expresión ectópica de una de las ciclinas mitóticas, concretamente la B2;2, para que se produjera el salto de S a mitosis en presencia de cafeína en plantas (18). Así pues, la expresión de una ciclina concreta en una etapa del ciclo celular se comporta como un mecanismo de seguridad que evita saltos a etapas del ciclo posteriores, pero no adyacentes.

16. LA SALIDA DEL CICLO HACIA DORMANCIA O HACIA APOPTOSIS: INDUCCIÓN DE NUEVOS PATRONES DE EXPRESIÓN

Si una célula no es capaz de eliminar el daño remanente que activó la ruta de chequeo G2, cuenta todavía con otras dos opciones alternativas a la adaptación al chequeo. Pero ambas requieren la iniciación de un nuevo programa de transcripción que, una vez iniciado, es difícilmente reversible.

La primera de las opciones se trata de la salida de proliferación (G2) hacia dormancia (G0,2), lo que se consigue mediante la síntesis de inhibidores fisiológicos de los complejos CDK-ciclinas, es decir, de una KRP de plantas (10).

La segunda opción consiste en la iniciación de un programa de auto-destrucción o suicidio de la célula, conocido como apoptosis. Nuestro grupo ha constatado que las células vegetales activan este programa en respuesta a daño radioinducido en su genoma. La elección entre adaptación a la ruta de chequeo o apoptosis tiene lugar en G2. La apoptosis se ve favorecida al incrementar la dosis de irradiación y, por lo tanto, el daño en su ADN (38).

En resumen, a pesar de las diferencias comentadas, los hallazgos correspondientes a los controles positivos y los de chequeo del ciclo celular siguen líneas maestras semejantes en células vegetales y animales. La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y de *Oryza sativa* y las herramientas moleculares hoy disponibles ponen a nuestro alcance la posibilidad de diseñar un diagrama de interacciones entre la maquinaria de chequeo de ciclo y la de reparación del ADN, por ejemplo, que era imposible hasta hace poco.

Los hallazgos sobre regulación negativa de la proliferación han desembocado en el modelo actual de ciclo, en el que se integra la existencia de un acelerador o mecanismo mitogénico, que favorece el avance de la célula en el ciclo y, superpuesto a él, rutas de chequeo que frenan transiciones irreversibles concretas en situaciones de riesgo. La caducidad de estas rutas suele llevar al desarrollo de inestabilidad genómica en una fracción de las células inicialmente frenadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a doña Margarita Carrascosa y a don José Luis Marcilla su valiosa ayuda y apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo. Agradezco también la financiación de la actividad del grupo que dirijo, en los últimos tres años, a la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BMC2001-2195).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2**. *Cell* 54: 433-439.
- (2) SHIMOTOHNO, A.; MATSUBAYASHI, S.; YAMAGUCHI, M.; UCHIMIYA, H.; UMEDA, M. (2003) Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 534: 69-74.
- (3) FABIAN-MARWEDEL, T.; UMEDA, M.; SAUTER, M. (2002) The rice cyclin-dependent kinase-activating kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell* 14: 197-210.
- (4) MARGULIS, L.; FESTER, R. (1991) Symbiosis as source of evolutionary innovation: Speciation and morphogenesis. *Symbiosis* 11: 93-111.
- (5) TORRES-ACOSTA, J. A.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; RAES, J.; MAGYAR, Z.; DE GROODT, R.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. (2004) Molecular characterization of Arabidopsis PHO80-like proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. *Cell. Mol. Life Sci.* 1: 1485-1497.
- (6) TSAKRAKLIDES, V.; SOLOMON, M. J. (2002) Comparison of Cak1p-like cyclin-dependent kinase-activating kinases. *J. Biol. Chem.* 277: 33482-33489.
- (7) VANDEPOELE, K.; REES, J.; DE VEYLDER, L.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S.; E INZÉ, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 903-916.
- (8) MENGES, M.; DE JAGGER, S. M.; GRUISSEM, W.; MURRAY, J. A. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41: 546-566.
- (9) ZHANG, K.; LETHAM, D. S.; JOHN, P. C. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2-12.
- (10) ORMENESE, S.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; DE GROODT, R.; DE VEYLDER, L.; INZÉ, D.; JACQARD, A. (2004) Analysis of the spatial expression pattern of seven Kips related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 93: 575-580.

- (11) JOUBÈS, J.; CHEVALIER, C.; DUDITS, D.; HEBERLE-BORS, E.; INZÉ, D.; UMEDA, M.; RENAUDIN, J. P. (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 607-620.
- (12) MAGYAR, Z.; MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; DEÁK, M.; FEHÉR, A.; BROWN, S.; KONDOROSI, E.; ATHANASIADIS, A.; PONGOR, S.; BILGIN, M.; BAKÓ, L.; KONCZ, C.; DUDITS, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223-235.
- (13) XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A. P.; HANNON, G. J.; GUTIÉRREZ, C. (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900-4908.
- (14) SÁNCHEZ, M. P.; TORRES, M. B.; GUTIÉRREZ, C.; VÁZQUEZ-RAMOS, J. M. (2002) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* 50: 167-175.
- (15) BARROCO, R. M.; DE VEYLDER, L.; MAGYAR, Z.; ENGLER, G.; INZÉ, D.; MIRONOV, V. (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 401-412.
- (16) CHAUBET-GIGOT, N. (2000) Plant A-type cyclins. *Plant Mol. Biol.* 43: 659-675.
- (17) ITO, M. (2000) Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* 43: 677-690.
- (18) WEINGARTNER, M.; CRIQUI, M. C.; MÉSZÁROS, T.; BINAROVA, P.; SCHMIT, A. C.; HELFER, A.; DEREVIER, A.; ERHARDT, M.; BÖGRE, L.; GENSHIK, P. (2004) Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* 16: 643-657.
- (19) WEINGARTNER, M.; PELAYO, H. R.; BINAROVA, P.; ZWARGER, K.; MELIKANT, B.; DE LA TORRE, C.; HEBERLE-BORS, E.; BÖGRE, L. (2003) A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G₂-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J. Cell Sci.* 116: 487-498.
- (20) GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; WEINGARTNER, M.; BINAROVA, P.; CLARKE, D. J.; ANTHONY, R. G.; CALDERINI, O.; HEBERLE-BORS, E.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; BÖGRE, L.; DE LA TORRE, C. (2002). A topoisomerase II-dependent checkpoint in G₂-phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic Cyclin B2. *Cell Cycle* 1: 187-192.
- (21) FURUNO, N.; DEN ELZEN, N.; PINES, J. (1999) Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J. Cell Biol.* 147: 295-306.
- (22) GARCÍA-HERDUGO, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E.; HIDALGO, J.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. (1974) Effects of protein synthesis inhibition during plant mitosis. *Exp. Cell Res.* 89: 336-342.
- (23) SONI, R.; CARMICHAEL, P.; SHAH, Z. H.; MURRAY, J. A. H. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.
- (24) DE VEYLDER, L.; SEGERS, G.; GLAB, N.; CASTEELS, P.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1997) The *Arabidopsis* CKs1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett.* 412: 446-452.

- (25) PELAYO, H. R.; PINCHEIRA, J.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; CLARKE, D. J.; DE LA TORRE, C. (2003) p-53 Independent checkpoint control in a plant cell model. *Biol. Res.* 36: 381-388.
- (26) WEINERT, T.; HARTWELL, L. H. (1989) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322.
- (27) WALWORTH, N.; DAVEY, S.; BEACH, D. (1993) Fission yeast kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363: 368-371.
- (28) GARCÍA, V.; SALANOUBAT, M.; CHOISNEN, Y.; TISSIER, A. (2000) An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana*: Complete genome organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 28: 1692-1699.
- (29) CULLIGAN, K.; TISSIER, A.; BRITT, A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1091-1104.
- (30) LAFARGÉ, S.; MONTANÉ, M. H. (2003) Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res.* 31: 1148-1155.
- (31) GERHARD, J.; KIRSCHNER, M. (1979) Cells, embryos and evolution. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- (32) PÉREZ-TALAVERA, S.; CARBALLO, J. A.; DE LA TORRE, C. (2003) Lack of mitotic delays at the onset of proliferation in dormant root primordia challenged by ionizing radiation. *Biol. Plant. (Prague)* 46: 383-387.
- (33) RAMÍREZ-PARRA, E.; XIE, Q.; BONIOTTI, M. B.; GUTIÉRREZ, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27: 3527-3533.
- (34) PELAYO, H. R.; LASTRES, P.; DE LA TORRE, C. (2001) Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* 212: 444-453.
- (35) SANTOCANALE, C.; DIFFLEY, J. F. X. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395: 615-618.
- (36) GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DíEZ, J. L.; DE LA TORRE, C.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. (1971) Interphase development and beginning of mitosis in the different nuclei of polynucleate homokaryotic cells. *Chromosoma* 36: 100-111.
- (37) DEL CAMPO, A., GIMÉNEZ-MARTÍN, G., LÓPEZ-SÁEZ, J. F. y DE LA TORRE, C. (1997) Frailty of two checkpoint stages which prevent entry into mitosis and progression through early mitotic stages in higher plant cells. *Eur. J. Cell Biol* 74, 289-293.
- (38) CARBALLO J. A. (2003) Destinos alternativos de células proliferantes de plantas tratadas con radiación ionizante. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- (39) RIEDER, C. L.; COLE, R. W.; KHODJAKOV, A.; SLUDER, G. (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 130: 941-948.
- (40) TAM, S. W.; BELINSKY, G. S.; SCHLEGEL, R. (1995) Premature expression of cyclin B sensitizes human HT1080 cells to caffeine-induced premature mitosis. *J. Cell Biochem.* 59: 339-349.

El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o «mole seca» del champiñón

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA
*Académica Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

La presente revisión contempla diferentes aspectos de la micosis producida por *Verticillium fungicola* en los cultivos comerciales de *Agaricus bisporus* o champiñón. Las diferentes interacciones producidas por la estructura química característica de las paredes celulares de ambos organismos: a) la adhesión inespecífica debida a la presencia de la proteína hidrofobina en las tres clases de paredes celulares estudiadas (micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* y micelio de *V. fungicola*), b) el reconocimiento y unión específicos entre el polisacárido glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola* y la glicoproteína lectina del micelio agregado de *A. bisporus*, y c) finalmente la degradación enzimática selectiva de las paredes celulares del micelio agregado o carpóforos de este último organismo por las enzimas líticas de *V. fungicola*, constituyen los puntos desarrollados.

Palabras clave: Micoparasitismo.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Pared celular.—Polisacáridos.—Glucogalactomanano.—Proteínas.—Hidrofobina.—Lectina.—Enzimas líticas.

SUMMARY

The *Verticillium fungicola* mycoparasitism on the *Agaricus bisporus* fruit bodies: the *Verticillium* disease or «dry bubble» of mushrooms

The present review describes different aspects of the mycosis produced by *Verticillium fungicola* on the industrial cultures of *Agaricus bisporus* or common white button mushroom. The different interactions produced by the characteristic chemical structure of the cell walls of both organisms: a) the unspecific adhesion due to the presence of the protein hydrophobin in the three kinds of cell walls studied (*A. bisporus* vegetative and aggregated mycelia and *V. fungicola* mycelium), b) the specific recognition and binding between the polysaccharide glucogalactomannan from the *V. fungicola* cell walls with the *A. bisporus* aggregated mycelium glycoprotein lectin, and c) finally the selective enzymatic degradation of the fruit body cell walls of this last organism by the *V. fungicola* lytic enzymes, constitute the points developed.

Key words: Mycoparasitism.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Cell wall.—Polysaccharides.—Glucogalactomannan.—Proteins.—Hydrophobin.—Lectin.—Lytic enzymes.

INTRODUCCIÓN

El micoparasitismo verticiliosis o «mole seca» de los cultivos industriales de champiñón es la micosis producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola* (Preuss, Hassebrauk) sobre el micelio agregado de los carpóforos (cuerpos fructíferos o setas) del hongo Basidiomiceto *Agaricus bisporus* (Lange, Imbach).

Esta enfermedad puede llegar a destruir una cosecha en dos o tres semanas, lo que representa un grave problema económico dentro del sector, alcanzándose anualmente en el mundo pérdidas de varios cientos de millones de euros. La micosis que nos ocupa ha tratado de controlarse introduciendo medidas de higiene tanto en las instalaciones como en el personal cultivador, así como mediante la aplicación rutinaria de fungicidas como el Procloraz-Mn, pero es difícil encontrar sustancias químicas selectivas que destruyan o inhiban al micopatógeno sin afectar al menos en parte al hospedador, dada la circunstancia de que ambos organismos pertenecen al reino de los hongos. A lo largo de la última década se ha podido observar una mayor incidencia de verticiliosis en los cultivos industriales de

champiñón en España, a pesar del consiguiente uso preventivo del Prochloraz-Mn, lo que sugiere el desarrollo de una posible resistencia por parte del micopatógeno frente al fungicida (1).

El síndrome de la micosis en los cultivos industriales de champiñón se asocia a tres tipos de síntomas dependiendo de la etapa de desarrollo del carpóforo en que se produzca la infección (2, 3). Cuando los cultivos se infectan en una etapa temprana de su desarrollo, en la fase de primordio, en lugar de champiñones aparecen unas masas esféricas de tejido micelial donde no existe diferenciación entre pie, sombrerillo y laminillas, que se denominan «bolas o mole seca». Si los cultivos son afectados en una fase más avanzada de dicho desarrollo de los champiñones, cuando ya existe diferenciación entre estúpite y píleo, aparecen claras deformaciones al arquearse primeramente el pie, lo que se conoce con el nombre de «pie o labio de liebre», debido a que las hifas afectadas han detenido su crecimiento mientras que las no infectadas continúan su crecimiento apical. Finalmente cuando se infectan los carpóforos completamente diferenciados aparecen en su superficie unas «manchas o moteado» de color pardo junto con lesiones necróticas, debido a la penetración del parásito dentro de la masa micelial de los carpóforos (Fig. 1).

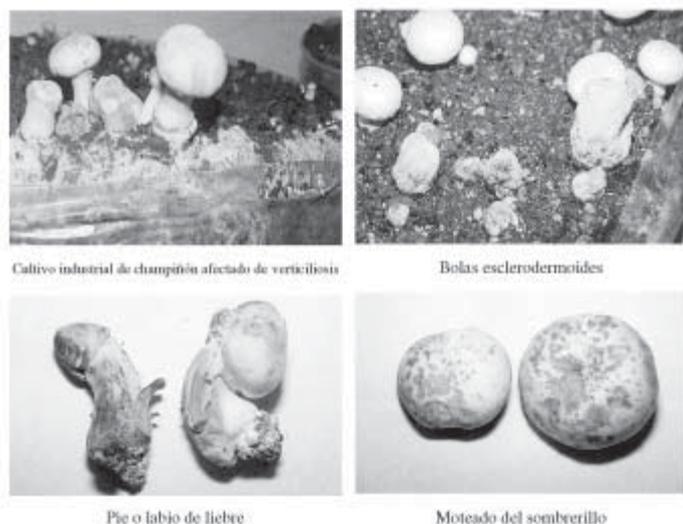


FIGURA 1. Síntomas de la verticiliosis o «mole seca» de los cultivos industriales de champiñón. Fuente: Ref. 3.

Gracias a los estudios realizados mediante microscopía electrónica se ha podido demostrar recientemente que el micopatógeno se desarrolla tanto inter- como intracelularmente (Fig. 2) en las hifas del micelio agregado de dichos carpóforos de *A. bisporus* (4-6). La fase visible del proceso infectivo se debe a la secreción de enzimas extracelulares por parte de *V. fungicola* que conduce finalmente a la necrosis de los citados carpóforos de *A. bisporus* (7-9). Estas enzimas han sido estudiadas por Calonje et al. (5) y entre ellas se han identificado exo- y endopolisacaridasas y proteasas, algunas de las cuales incrementan su producción en presencia de las paredes celulares del micelio agregado del hospedador *A. bisporus* (5).

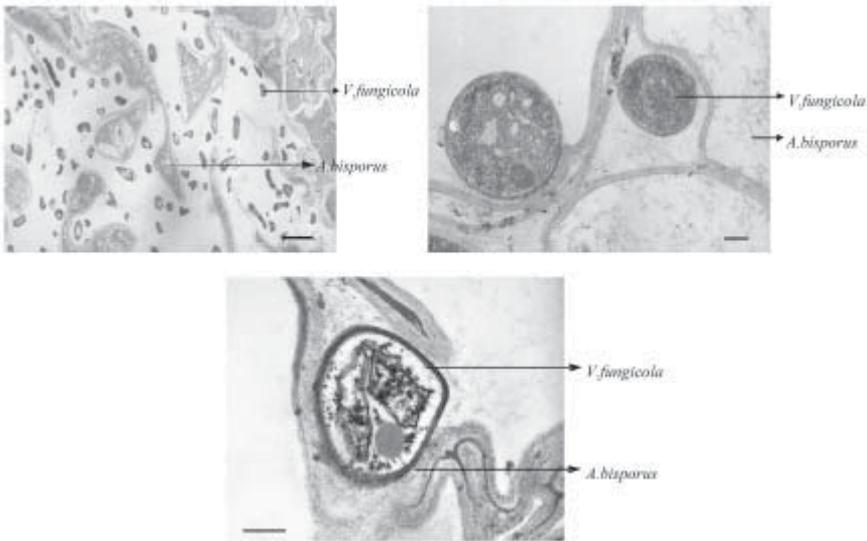


FIGURA 2. Interacción entre el micopatógeno *V. fungicola* y su hospedador *A. bisporus* observada en el microscopio electrónico de transmisión. Las barras corresponden a 2 μm , 0,5 μm y 0,5 μm respectivamente. Fuente: Ref. 6.

Pero antes de que aparezcan los síntomas evidentes de la infección, parecen existir interacciones celulares y moleculares específicas entre el micopatógeno y el hospedador, de forma semejante a como ha sido descrito en otros casos de micoparasitismo (10), de tal manera que primero se produciría una adhesión más o menos inespecífica entre ellos, a la que seguiría un reconocimiento y/o unión específicos, cuando se trata de organismos compatibles.

En el caso del micelio vegetativo de *A. bisporus*, aunque se produzca un aparente contacto entre el hospedador y el micopatógeno (11), sin embargo no tiene lugar la posterior degradación enzimática *in vivo* (11), por lo que dicho micelio vegetativo se comporta como no compatible frente a *V. fungicola*, y debido a ello finalmente no desarrolla la enfermedad.

El hecho de que dicho micelio vegetativo no sea digerido por las enzimas de *V. fungicola*, y que las paredes celulares de ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* presenten diferencias estructurales considerables (12, 13) demuestra el importante papel que desempeñan las paredes celulares de ambos organismos en la micosis que nos ocupa.

Todos los aspectos que acabamos de reseñar van a ser tratados más detalladamente a lo largo del presente trabajo.

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PAREDES CELULARES DE *AGARICUS BISPORUS* Y *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

La pared celular fúngica es la estructura externa y rígida de la célula, situada a continuación de la membrana plasmática, cuya función principal es mantener la forma de los organismos que la poseen, protegiéndola de los posibles daños mecánicos, químicos y osmóticos. Dicha estructura no se comporta de forma inerte sino que participa en fenómenos activos de superficie, interacciones celulares e inmunidad, mostrando además una significativa actividad enzimática que se manifiesta durante el crecimiento celular al presentar tal pared claras modificaciones tanto en su composición química como en su arquitectura molecular, para lo que intervienen enzimas biosintéticas y degradativas de los polímeros polisacáridos que la conforman que, correctamente ensamblados, proporcionan a la misma su organización característica.

Sus principales componentes son homopolisacáridos, como glucanos α -(1-3), α -(1-4), β -(1-3) y β -(1-3) (1-6), mananos, quitina, quitosano, celulosa y ácido poliglucurónico (14-16), así como heteropolisacáridos como manoglucogalactanos (17), glucogalactomananos (18), galactomanoglucanos (19), etc. El esqueleto microfibrilar

está constituido generalmente por quitina y en unos pocos casos por celulosa, ambas embebidas en otros polímeros y proteínas, formando la capa más interna, mientras que la(s) capa(s) más externa(s) contiene(n) diferentes tipos de polisacáridos (20, 21). La mezcla de fibrillas y polímeros matrices que rellenan la malla fibrilar confieren características especiales a la pared, que la célula puede controlar y modificar durante el crecimiento y diferenciación.

Las paredes celulares de los dos hongos que nos ocupan pertenecen al modelo con quitina, y existe amplia bibliografía acerca de su composición y estructura químicas (12, 13, 22-25).

El análisis químico global de las paredes de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* muestra diferencias significativas que se ven claramente incrementadas después de los estudios de estructura química. Mediante solubilización química gradual de los polisacáridos seguida de análisis estructurales (cromatografía gas-líquido, CGL, y después de metilación, CGL asociada a espectrometría de masas, EM) ha sido posible describir la complejidad de las fracciones aisladas. Así la fracción F I o mucílago es muy similar en ambos micelios y corresponde esencialmente a un (1-4) glucano con bajo porcentaje de ramificaciones. La fracción F II está constituida por residuos de (1-3) glucosa y (1-3) manosa, ambos ramificados parcialmente, junto con xilosa principalmente como residuo terminal, mostrando este azúcar una mayor proporción en las paredes del micelio vegetativo, e igualmente mayor porcentaje de las ramificaciones de manosa que en el micelio agregado. La fracción F III presenta grandes diferencias en ambos tipos de micelios, mostrando en el micelio vegetativo una mayoría de residuos de (1-4) glucosa junto con (1-4) xilosa, mientras que en el agregado esta compuesta por residuos de (1-6) glucosa y menor proporción de glucosa en (1-3) y (1-3, 6) glucosa. La fracción F IV continúa enriqueciéndose en los enlaces (1-6) glucosa en el micelio agregado frente a los (1-4) glucosa en el micelio vegetativo y finalmente las fracciones F V y F VI muestran igualmente mayor proporción de residuos de (1-4) glucosa en las paredes del micelio vegetativo y de (1-6) glucosa en las del micelio agregado.

Comparando las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones aisladas, se observa que las paredes del micelio vegetativo

presentan mayor porcentaje de las fracciones más externas I y II, mientras que en el micelio agregado dichas fracciones descienden, aumentando sin embargo las fracciones más internas IV, V y VI. Este hecho junto con la mayor proporción de quitina en las paredes de micelio agregado, y la presencia de mayores cantidades de xilosa, manosa y galactosa en las paredes del micelio vegetativo nos demuestran una naturaleza más heteropolisacarídica de estas últimas paredes. También conviene destacar el mayor porcentaje de enlaces de (1-6) glucosa en las paredes de micelio agregado con el incremento correspondiente de los enlaces de glucosa en (1-3, 6), variaciones que pueden ser necesarias para la movilización y posterior reorganización de los polisacáridos en la consiguiente diferenciación celular.

La presencia de proteína en las paredes celulares fúngicas es un hecho demostrado. En ambas clases de paredes de *A. bisporus* una cantidad significativa de proteína es solubilizada junto con los polisacáridos a lo largo del fraccionamiento a que acabamos de hacer referencia, pero sin embargo las proteínas hidrofobinas, presentes en ambos tipos de paredes (26, 27), requieren un tratamiento de solubilización especial, por lo que los perfiles electroforéticos obtenidos en cada caso dependen de las condiciones de solubilización utilizadas. De todo ello se deduce que tanto los enlaces de hidrógeno como los puentes disulfuro están presentes en la fracción proteica de estas paredes.

Las paredes celulares miceliales de *V. fungicola* requieren igualmente un fraccionamiento específico para poder estudiar su estructura química. Los componentes polisacarídicos mayoritarios son glucanos y glucogalactomananos asociados ambos en las fracciones F1 y F2S, así como también los glucanos con quitina en la fracción F 3. Estos glucanos muestran diferentes tipos de enlaces (1-3), (1-4) y (1-6) con ramificaciones en algunas unidades en posición C-6 para las dos primeras fracciones glucánicas y con un menor porcentaje de ramificaciones en posición C-2 para el glucano de la fracción F 3. Las fracciones F1b y F2Sb están constituidas por glucogalactomanano formado por un esqueleto de (1-6) manosa altamente ramificado en los puntos C-4 y con galactopiranososa y glucopiranososa como residuos terminales (25, 28).

Las proteínas también están bien representadas en las paredes celulares de *V. fungicola*, e igualmente se solubilizan parcialmente

con el proceso de fraccionamiento de los polisacáridos. Recientemente Calonje et al. (29) han demostrado la existencia de otra proteína hidrofobina en estas paredes celulares así como también en los caldos de cultivo de este organismo y, la presencia de al menos seis puentes disulfuro en su reducida masa molecular, justifica en parte sus propiedades de resistencia e insolubilidad.

La disposición de los polisacáridos dentro de las tres clases de paredes celulares estudiadas (Fig. 3) ha podido ser deducida gracias al fraccionamiento químico progresivo seguido de análisis estructural (CGL y CGL-EM), microscopía electrónica de transmisión (cortes finos y sombreados) y degradación enzimática secuencial (30).

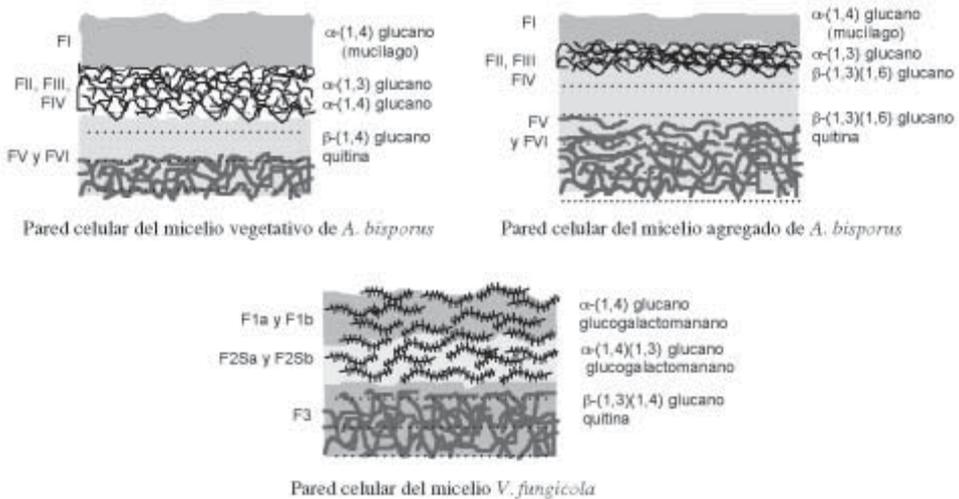


FIGURA 3. Distribución comparativa de los componentes polisacáridicos de las tres clases de paredes celulares deducida del fraccionamiento químico progresivo seguido de análisis estructural (CGL y CGL-EM), de la microscopía electrónica con cortes ultrafinos y sombreados, y de la degradación enzimática secuencial. Fuente: Refs. 30 y 40.

La importancia de la estructura química de las paredes celulares de los organismos involucrados en un fenómeno de micoparasitismo es un hecho demostrado, toda vez que dicho parasitismo parece ser un proceso complejo en el que tienen lugar sucesivos pasos en los que se encuentran claramente implicadas las citadas paredes celulares.

res (31, 32). Un primer paso de contacto por interacciones hidrofóbicas ha sido sugerido por Umar et al. (33) entre el micoparásito *Mycogone pernicioso* y el hospedador *A. bisporus*. En este sentido el hecho de que nuestros dos organismos objeto de estudio posean la proteína hidrofobina en su superficie celular corrobora dicha hipótesis, ya que las hidrofobinas han mostrado su propiedad de adhesión entre superficies hidrofílicas e hidrofóbicas (34). Así, el primer paso de adhesión inespecífica tendría lugar entre las superficies hidrofílicas del mucílago asociado a hidrofobina en ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* con la superficie hidrofóbica de *V. fungicola* (29), mientras que el paso subsiguiente debería ser el reconocimiento y unión específicos entre las superficies celulares de ambos organismos involucrando interacciones entre moléculas complementarias.

RECONOCIMIENTO Y UNIÓN DEL GLUCOGALACTOMANANO DE LAS PAREDES CELULARES DE *VERTICILLIUM FUNGICOLA* CON LA LECTINA DEL MICELIO AGREGADO DE *AGARICUS BISPORUS*

La hipótesis formulada en relación con el citado paso de reconocimiento y unión específicos entre moléculas complementarias presentes en *V. fungicola* y *A. bisporus* ha podido ser demostrada recientemente (35). Experimentos preliminares de aglutinación de esporas germinadas de *V. fungicola* en presencia de extractos proteicos de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* indicaron la presencia de alguna proteína en este último organismo con una alta actividad aglutinante hacia el organismo micopatógeno (36).

Por otra parte, experimentos previos de inmunofluorescencia microscópica (25) habían mostrado que el micelio de *V. fungicola* presentaba fuerte fluorescencia después de su reacción con anticuerpos policlonales preparados contra el glucogalactomanano de *Penicillium fumosoroseus* (37), cuya estructura química es similar a la del glucogalactomanano de *V. fungicola*, habiendo acoplado a la reacción un anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo para poder visualizarla. Como consecuencia de este hallazgo la incubación del glucogalactomanano de *V. fungicola* purificado (25) junto

con las hifas de micelio vegetativo o agregado de *A. bisporus*, efectuando a continuación la inmunofluorescencia indirecta, sirvió para desentrañar el proceso (36). Los resultados de estos experimentos mostraron que mientras las hifas del micelio agregado de *A. bisporus* así tratadas mostraban fluorescencia positiva, las correspondientes del micelio vegetativo permanecían sin desarrollar fluorescencia como también ocurría con los controles adicionados con suero preinmune, lo que sugería el reconocimiento y unión específicos entre el carbohidrato glucogalactomanano de *V. fungicola* y una proteína de las hifas del micelio agregado de *A. bisporus*, posiblemente una interacción del tipo carbohidrato-lectina, proteína sin embargo ausente en el micelio vegetativo del hospedador donde no se produce el citado reconocimiento y unión (36).

Los estudios subsiguientes se enfocaron hacia el aislamiento, purificación y caracterización de una proteína lectina de *A. bisporus* que corroborara nuestros resultados de aglutinación e inmunofluorescencia indirecta precedentes. Como resultado de los mismos y después de su caracterización mediante hemaglutinación se pudo demostrar la presencia de una glicoproteína lectina en el micelio agregado del hospedador (35), lectina que no se expresa en el correspondiente micelio vegetativo, y que muestra una alta afinidad hacia el glucogalactomanano de las paredes celulares de *V. fungicola*, con lo que quedan confirmados todos los pasos del proceso que se habían supuesto previamente (Fig. 4).

DEGRADACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DEL MICELIO AGREGADO DE *AGARICUS BISPORUS* POR LAS ENZIMAS LÍTICAS DE *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

Los hongos patógenos penetran en las células de los tejidos de sus correspondientes hospedadores para poder establecer la infección. En muchos casos la penetración tiene lugar a través de orificios naturales, heridas, o mediante la formación de estructuras especializadas junto con fuerzas mecánicas, seguidas de degradación enzimática, etc., o la combinación de varias de estas posibilidades, dando lugar a la colonización de las células del hospedador por el patógeno.

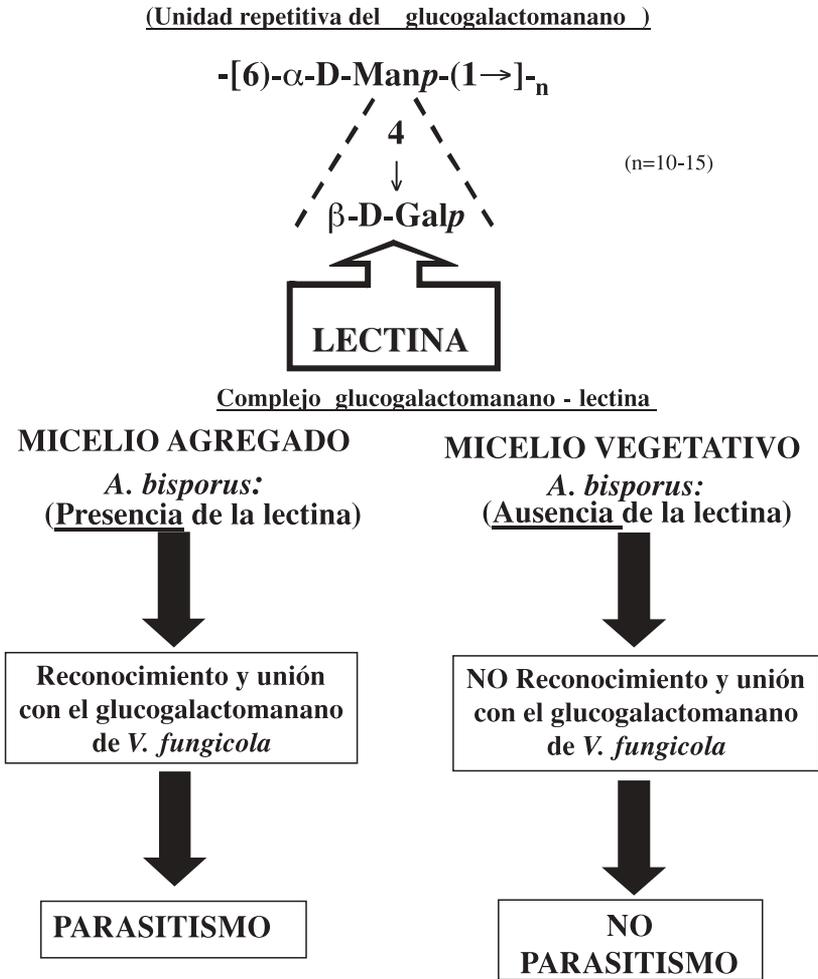


FIGURA 4. Esquema resumen del diferente comportamiento de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* frente al micoparasitismo de *V. fungicola*.

Los primeros estudios realizados sobre el parasitismo de *V. fungicola* sobre los carpóforos de *A. bisporus* mostraron el desarrollo de una digestión enzimática localizada que finalmente conducía a la necrosis de tales cuerpos fructíferos (7-9). Seguidamente Dragt et al. (4) pusieron de manifiesto la presencia en el parásito de ciertas estructuras del tipo de apresorios, sugiriendo un efecto combinado de degradación enzimática junto con presión mecánica. Finalmen-

te Calonje et al. (5) describieron que las enzimas secretadas *in vivo* por *V. fungicola* creciendo sobre paredes celulares aisladas del micelio agregado de *A. bisporus* podrían servir como indicadores de las enzimas que el patógeno produce durante su parasitismo, identificando en tales caldos metabólicos endopolisacaridasas como α -(1-3)-, α -(1-4)-, β -(1-3)-, β -(1-4)-, β -(1-6)-glucanasas, β -(1-4)-xilanasas y quitinasas, disacaridasas como quitobiosidasas, exopolisacaridasas como α -D- y β -D-glucosidasas, β -D-xilosidasas, β -D-manosidasas y N-acetil- β -D-glucosaminidasas, junto con proteasas. Algunas de estas enzimas que son claves en la lisis de las paredes celulares de los hongos superiores son también producidas por otros microorganismos descritos como parásitos fúngicos (38, 39).

La digestión *in vitro* de las paredes celulares aisladas del micelio agregado de *A. bisporus* con las enzimas producidas por *V. fungicola* estudiada mediante microscopía electrónica ha mostrado que tal degradación no ocurre simultáneamente y con la misma intensidad en la capa externa que en la interna de dichas paredes celulares (5), aunque al final del proceso aparezcan zonas completamente lisadas, lo que permite que el micopatógeno *in vivo* se pueda encontrar tanto inter- como intracelularmente de las hifas de los carpóforos.

Experimentos semejantes realizados con las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* han puesto de manifiesto que, aunque *in vitro* se consiga una degradación enzimática de tales paredes celulares aisladas con los enzimas producidos por *V. fungicola*, *in vivo* únicamente se produce un contacto aparente entre el micoparásito y el hospedador (11) gracias a las interacciones hidrofóbicas descritas, sin llegar a producirse la consiguiente degradación enzimática, por lo que este micelio no desarrolla la infección. Estos resultados corroboran la ausencia de la glicoproteína lectina en el micelio vegetativo de *A. bisporus* y por tanto la falta de reconocimiento y unión con el glucogalactomanano de *V. fungicola* en esta clase de micelio, lo que nos confirma una vez más la existencia de los pasos previos a la digestión enzimática necesarios para el desarrollo de la verticiliosis.

CONSIDERACIONES FINALES

Una vez desentrañados, a nivel bioquímico, los mecanismos celulares y moleculares necesarios entre el micoparásito y el hospedador para que se manifieste la verticiliosis o «mole seca» del champiñón, *a*) la adhesión inespecífica, *b*) el reconocimiento y unión específicos, y finalmente *c*) la digestión enzimática de las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* mediante las enzimas hidrolíticas de *V. fungicola*, se hace necesaria la aproximación experimental genética. La posible transformación genética de *A. bisporus* en su glicoproteína lectina con la construcción de cepas «no adherentes» a *V. fungicola*, supondría una vía alternativa de erradicación de la verticiliosis, sin el uso rutinario de fungicidas, cuya utilización continuada está produciendo microorganismos resistentes indeseados (1). La contribución científica propuesta repercutiría además en una mejora de la nutrición y consecuentemente de la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos experimentales actuales de la autora de esta revisión y que forman parte de la misma han sido financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, AGL 2001-1885) así como por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (188/CH-51).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GEA, F. J.; TELLO, J. C.; HONRUBIA, M. (1996) *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* 136: 133-137.
- (2) NORTH, L. H.; WUEST, P. (1993) The infection process and symptom of Verticillium disease of *Agaricus bisporus*. *Can. J. Plant Pathol.* 15: 74-80.
- (3) GEA ALEGRÍA, F. J. (1995) Micosis del cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) en Castilla-La Mancha. Estudio de la verticiliosis (agente causal: *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk). Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, pp. 206-208.
- (4) DRAGT, J. W.; GELLS, F. P.; DE BRUIJN, C.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (1996) Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycol. Res.* 100: 1082-1086.

- (5) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; GALÁN, B.; NOVAES-LEDIEU, M. (1997) Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* 143: 2999-3006.
- (6) BERNARDO LÓPEZ, M. D. (2003) Bases celulares y moleculares de la verticiliosis (producida por *Verticillium fungicola*) de los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*) y efecto del fungicida Procloraz-Mn. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, pp. 135.
- (7) KALBERER, P. (1984) Some properties of extracellular proteolytic enzyme of *Verticillium fungicola*, a pathogen of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Phytopathol. Z.* 110: 213-220.
- (8) THAPA, C. D.; JANDAİK, C. L. (1987) Physicochemical changes in *Agaricus bisporus* (Lange) Singer due to infection of *Verticillium fungicola* (Preuss) Hasseber. *Dev. Crop Science* 10: 411-417.
- (9) TRIGIANO, R. N.; FERGUS, C. L. (1979) Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia* 71: 908-917.
- (10) MANOCHA, M. S.; CHEN, Y.; RAO, N. (1990) Involvement of cell surface sugars in recognition, attachment, and appressorium formation by a mycoparasite. *Can. J. Microbiol.* 36: 771-778.
- (11) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M. (2000) Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104: 988-992.
- (12) GARCÍA MENDOZA, C.; AVELLÁN, M. A.; SÁNCHEZ, E.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987) Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* 148: 68-71.
- (13) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; NOVAES-LEDIEU, M. (1996) New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*. *Microbiología SEM* 12: 599-606.
- (14) ROSEMBERGER, R. E. (1976) The cell wall. En: *The filamentous fungi*, Vol. II, J. E. Smith y D. R. Berry (eds.), Edward Arnold Publishers, Londres, pp. 328-344.
- (15) WESSELS, J. G. H.; SIETSMA, J. H. (1981) Fungal cell walls. En: *Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates*, W. Tanner y F. A. Loewus (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y., pp. 352-394.
- (16) BARTNICKI-GARCÍA, S.; LIPPMAN, E. (1982) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. En: *Handbook of Microbiology*, Vol. IV, A. I. Laskin y H. Lechevalier (eds.), CRC, pp. 229-252.
- (17) RUPÉREZ, P.; LEAL, J. A. (1987) Mannoglucogalactans from the cell walls of *Penicillium erythromellis*: isolation and partial characterization. *Carbohydr. Res.* 167: 269-278.
- (18) PRIETO, A.; RUPÉREZ, P.; HERNÁNDEZ BARRANCO, A.; LEAL, J. A. (1988) Partial characterization of galactofuranose-containing heteropolysaccharides from the cell walls of *Talaromyces helicus*. *Carbohydr. Res.* 177: 268-272.
- (19) GÓMEZ MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A. (1990) Chemical composition and characterization of a galactomannoglucan from *Gliocladium viride* wall material. *FEMS Microbiology Lett.* 70: 331-336.

- (20) HUNSLEY, D.; BURNETT, J. H. (1970) The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 62: 203-218.
- (21) BURNETT, J. H. (1979) Aspects of the structure and growth of hyphal walls. En: *Fungal Walls and Hyphal Growth*. J. H. Burnett y A. P. J. Trinci (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-25.
- (22) MICHALENKO, G. O.; HOHL, H. R.; RAST, D. (1976) Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 251-262.
- (23) GARCÍA MENDOZA, C.; SÁNCHEZ, E.; NOVAES-LEDIEU, M. (1987) Differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 161-165.
- (24) MOL, P. C.; WESSELS, J. G. H. (1990) Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit-body stipes in *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 94: 472-479.
- (25) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O.; GARCÍA MENDOZA, C. (2000) Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (26) LUGONES, L. G.; BOSSCHER, J. S.; SCHOLTMAYER, K.; DE VRIES, O. M. H.; WESSELS, J. G. H. (1996) An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* 142: 1321-1329.
- (27) LUGONES, L. G.; WÖSTEN, H. A. B.; WESSELS, J. G. H. (1998) A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetative growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* 144: 2345-2353.
- (28) DOMENECH, J.; PRIETO, A.; GÓMEZ MIRANDA, B.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ BARBERO, J.; BERNABÉ, M. (2002) Structure of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of three strains of *Verticillium fungicola*. *Carbohydr. Polymers* 50: 209-212.
- (29) CALONJE, M.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; GARCÍA MENDOZA, C. (2002) Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-1034.
- (30) CALONJE MACAYA, M. (1998) Mecanismo de acción del micoparásito *Verticillium fungicola* en la infección al Basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, pp. 137-139.
- (31) CHET, I. (1987) *Trichoderma*- applications, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: *Innovative approaches to plant diseases*. I. Chet (ed.), John Wiley and Sons, New York, pp. 137-160.
- (32) MANOCHA, M. S.; CHEN, Y. (1990) Specificity of attachment of fungal parasites to their hosts. *Can. J. Microbiol.* 36: 69-76.
- (33) UMAR, M. H.; GEELS, F. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (2000) Pathology and pathogenesis of *Mycogone perniciosa* infection of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.* 15: 561-567.
- (34) WÖSTEN, H. A. B.; SCHUREN, F. H. J.; WESSELS, J. G. H. (1994) Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipatic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* 13: 5848-5854.
- (35) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M.; GARCÍA MENDOZA, C. (2004) *Verticillium* disease or «dry bubble» of the cultivated mushrooms: the *Agari-*

- cus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (36) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. (2003) Mechanisms involved in the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on *Agaricus bisporus* fruit bodies: *Verticillium* disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms. En: Recent Research Developments in Microbiology, Vol. 7, Part I. S. G. Pandalai (ed.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 269-278.
- (37) DOMENECH, J.; BARASOAIN, I.; PRIETO, A.; GÓMEZ MIRANDA, B.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. (1996) An antigenic water soluble glucogalactomannan extracted from cell walls of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces farinosus*. *Microbiology* 142: 3497-3503.
- (38) ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 719-725.
- (39) ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R. (1985) Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 131-148.
- (40) GARCÍA MENDOZA, C. (2000) Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anal. Real Acad. Farm.* 66: 5-22.

La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humanas

JOSÉ PÍO BELTRÁN

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

La recolección de simples, el aislamiento de productos naturales o las técnicas de la agricultura molecular, que permiten la modificación de las plantas mediante ingeniería genética para convertirlas en biofactorías de productos de interés farmacológico, constituyen distintas aproximaciones para utilizar las plantas en beneficio del hombre. En este trabajo se muestra la utilización del anticuerpo monoclonal A1, que reconoce la proteína específica de las anteras de flores de guisante (*Pisum sativum* L.) END1, para aislar el gen correspondiente y caracterizar su región promotora. Se muestra la capacidad de dicha región para dirigir la expresión del gen citotóxico *barnasa* específicamente a las anteras de distintas especies vegetales y construir plantas transgénicas androestériles que son la base para la producción de semillas híbridas generadoras de plantas con mayor vigor que las líneas parentales. Mediante dicha tecnología se han producido también frutos partenocárpicos de tomate de interés para la agricultura, la industria, la tecnología culinaria y el consumidor. Todo ello se enmarca en la situación actual y las perspectivas futuras que presenta el uso de la biotecnología vegetal en el campo de la nutrición y la salud.

Palabras clave: *Pisum sativum*.—*Lycopersicon esculentum*.—*Nicotiana tabacum*.—*Brassica napus*.—END1.—Plantas transgénicas androestériles.—Partenocarpia.

SUMMARY

Genetic Engineering of Crop Plants, a Key Approach to Improve Human Nutrition and Health

To collect wild type plants, to isolate plant natural products or to produce molecules of pharmacological interest by means of the so called molecular farming techniques with genetically engineered plants represent different approaches to the use of plants for human benefit. Here we show the isolation of the protein END1 and the corresponding coding gene, including its promoter region by means of the monoclonal antibody A1 which recognizes END1 expression in anthers of *Pisum sativum* plants. The ability of the *END1* promoter region to drive the expression of the cytotoxic gene *barnase* specifically to the anthers of different plant species is demonstrated. This allowed us to obtain male sterile plants needed to give rise to hybrid seeds characterized for producing plants more productive than their parental lines. Using the same biotechnological tools we have produced parthenocarpic tomato fruits of interest for farmers, industries, and consumers. These results are discussed in the frame of the current and future perspectives of plant biotechnology to improve human nutrition and health.

Key words: *Pisum sativum*.—*Lycopersicon esculentum*.—*Nicotiana tabacum*.—*Brassica napus*.—*END1*.—Androsterile transgenic plants.—Parthenocarpia.

INTRODUCCIÓN

Los objetivos científicos de la Biología vegetal tienen que ver con poder descifrar las pautas que gobiernan el desarrollo de las plantas y su respuesta frente a agentes patógenos y frente a estreses abióticos. El avance en la comprensión de los mecanismos que subyacen a los procesos vitales de las plantas debería permitir un mejor aprovechamiento de las mismas. Durante la segunda mitad del siglo pasado los abordajes experimentales utilizados variaron con la propia evolución de la metodología científica, desde los utilizados en Fisiología de organismos completos a los de la Fisiología y Bioquímica de órganos y tejidos y posteriormente a los de la Biología molecular y al análisis genético molecular de procesos de desarrollo, así como a la Ingeniería Genética. El uso de las plantas para mejorar la nutrición y salud humanas entronca con una de las tradiciones de la Farmacia, que en el pasado se concretaban en la elaboración de la Farmacopea y de la Triaca Magna. Para poder dirigir y controlar el uso de las plantas es necesario conocerlas en profundidad y a ese conocimiento han con-

tribuido numerosos farmacéuticos entre los que cabría destacar, entre otros, por orden cronológico y desde finales del siglo XIX a Mariano del Amo y Mora, a Blas Lázaro Ibiza, al gran farmacéutico y fitógrafo valenciano Carlos Pau Español, a Pío Font Quer y su Dioscórides renovado, a Mariano Losa España, al igual que a los miembros de la saga de los Rivas, comenzando por don Marcelo Rivas Mateos, los hermanos Juan y Salvador Rivas Goday y al hijo de este último, Salvador Rivas Martínez, ilustre Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia (1).

También fue muy relevante el papel jugado por los farmacéuticos en la introducción de la Bioquímica en España como es el caso de don José Rodríguez Carracido y don Ángel Santos Ruiz. De igual manera, y en esta recíproca relación Bioquímica/Botánica, quiero recordar al bioquímico vegetal, recientemente fallecido, don Roberto Fernández de Caleyá y Álvarez que, consciente de la importancia de unificar y modernizar las distintas floras españolas, impulsó e hizo posible el inicio del Programa *Flora Ibérica*, iniciativa que constituye el orgullo de los botánicos españoles y la envidia de los foráneos.

PRODUCIR MÁS ALIMENTOS, CON MAYOR VALOR NUTRICIONAL, Y MEJORAR LA SALUD HUMANA COMO OBJETIVOS PARA EL SIGLO XXI

La ingeniería genética permite cambiar en un solo gen el patrimonio genético de una especie cultivada. Las modificaciones que se pueden conseguir no están limitadas por la barrera de la especie; son dirigidas y se pueden obtener de forma más eficaz que las producidas, al azar, por hibridación o mutagénesis. Esta tecnología no se debe ver como una alternativa a la domesticación de las plantas y a las técnicas de mejora tradicional sino como un complemento. El ingeniero genético trabaja, en general, sobre variedades ya mejoradas.

A pesar del éxito de la conocida Revolución Verde (2) liderada en el siglo pasado por la obtención de los trigos híbridos enanos de Norman Borlaug, la mecanización del campo y el uso de fertilizantes y plaguicidas, hoy, 800 millones de personas pasan hambre o sufren malnutrición por defecto mientras que, también hoy, más de 800 millones son personas obesas y sufren, o sufrirán con alta probabi-

lidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares derivadas de un exceso o de una incorrecta alimentación.

Al margen de las valoraciones éticas o sociopolíticas que nos pueda merecer esta situación, está claro que tenemos ciertas deficiencias tecnológicas para garantizar una correcta alimentación y una buena salud para las generaciones futuras. La agricultura industrializada, heredera de las prácticas de la segunda Revolución Verde, es hoy muy productiva, aunque gasta muchos recursos al tiempo que también contamina mucho. De acuerdo con estimaciones de la FAO y de la Comisión Europea, la producción de alimentos necesitará seguir aumentando en el futuro inmediato (20, 25), y los alimentos deberán ser de alta calidad, seguros y baratos (3, 4). El reto consiste en dar un salto tecnológico a un tipo de agricultura sostenible capaz de producir más, utilizando menos recursos y contaminando menos y que, sobre todo, permita incorporar sus desarrollos a la práctica de la agricultura de subsistencia, práctica a la que están condenados hoy un gran número de agricultores, básicamente en el tercer mundo. No parece que para estos fines vayan a ser significativas *per se* las prácticas de la agricultura orgánica o agricultura ecológica (5, 6) que produce un tipo de alimento que responde, en parte, a las demandas de algunos ciudadanos del mundo desarrollado que, en casos extremos sufren una adicción enfermiza a los alimentos supuestamente naturales, denominada en términos psiquiátricos «Ortorexia» (7), adicción que afecta ya al 1 por 100 de los adultos jóvenes españoles y que viene a sumarse a los trastornos de la conducta alimentaria propios de los países que disponen de un exceso de alimentos.

La ingeniería genética, sin embargo, sí dispone de un potencial para contribuir a caminar en la dirección deseada (8). La ingeniería genética necesita, en primer lugar, disponer de métodos para identificar y aislar los genes responsables del carácter a modificar; asimismo, necesita disponer o desarrollar tecnologías de transformación genética no sólo para la especie sino, a veces, para la variedad que se desea mejorar. Recientemente se ha producido un avance en el desarrollo de genes delatores que permiten visualizar los transformantes *in vivo* en las primeras etapas de la transformación genética. Un ejemplo es el uso del gen que codifica para la proteína fluorescente GFP aislada de la medusa *Aequorea victoria*. El uso de la GFP ha sido muy útil en nuestro laboratorio en el desarrollo

de un método de transformación genética en el melocotonero para el que no existe alternativa actualmente (9). Conseguida la transformación genética estable, estamos en condiciones de abordar la introducción de genes que mejoren las características productivas o el comportamiento frente a diferentes estreses de los melocotoneros con el fin de producir plantas que se puedan incorporar a los programas de mejora. Nuestro método ya ha sido utilizado con éxito para transformar varias especies de *Prunus* ornamentales en Agriculture and Agri-Food Canada (comunicación personal de su director Daniel Brown).

Sólo si disponemos de los genes adecuados de las regiones promotoras para dirigir la expresión de los mismos a los órganos o tejidos «diana» y de los métodos de transformación específicos para la especie o incluso la variedad a mejorar, será posible construir estrategias para desarrollar plantas más productivas y con mayor valor nutricional, con un mejor comportamiento frente a condiciones adversas o, incluso, convertirlas en bio-factorías para la producción de compuestos de interés farmacológico o médico (10). La biotecnología vegetal también presenta algunos aspectos socialmente controvertidos a los que me referiré brevemente al final del artículo (11).

Plantas transgénicas que producen moléculas de interés farmacológico

Durante las últimas dos décadas no han cesado de aumentar los ejemplos de producción de moléculas de interés médico y farmacológico en plantas modificadas por ingeniería genética. Sin ánimo de ser exhaustivos, se puede producir ya en plantas la hormona del crecimiento humano; IgGs; la albúmina del suero humano; vacunas contra el virus de la hepatitis B; la alfa amilasa de uso industrial; IgAs; la elastina; la avidina; el colágeno humano; vacunas multi componentes contra la toxina del cólera y otros enteropatógenos; la proteína insecticida Bt; la tripsina bovina o conseguir la producción de anticuerpos en algas (12).

Por otra parte, aunque la primera generación de variedades transgénicas, con interés comercial, ha consistido básicamente de plantas de maíz resistentes a insectos y de plantas de soja tolerantes al

herbicida glifosato obtenidas por modificación de un solo gen, ya se está preparando la segunda generación con la que se persigue disponer de plantas con mayor valor nutricional, lo que a veces conlleva la modificación/introducción simultánea de varios genes (10).

De hecho, se intenta la producción de alimentos transgénicos funcionales, que son aquellos que, independientemente de su valor nutritivo, aportan algún componente importante para la salud del consumidor. Quizás el exponente más claro de este tipo de plantas sea el denominado «arroz dorado», desarrollado por Ingo Potrykus, arroz modificado por ingeniería genética para producir carotenoides con el objetivo de suplir la deficiencia en Vitamina A de más de 120 millones de personas malnutridas debido a la ingesta de dietas basadas en este cereal, con escaso o nulo consumo de frutas, legumbres y alimentos de origen animal. El arroz sólo posee parte de la ruta metabólica que produce la provitamina A. Potrykus y sus colaboradores introdujeron en el mismo los genes que codifican las enzimas fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (ambos aislados del narciso) y la fitoeno desaturasa (aislado de *Erwinia uredovora*) completando así dicha ruta metabólica (13). Esta variedad transgénica se ha incorporado a los programas de mejora genética tradicional del «Internacional Rice Research Institute» de Filipinas para transferir esta característica a las variedades autóctonas de uso en China, India, Sudeste asiático, África y América Latina (14).

La tecnología para insertar los enzimas de la vía de biosíntesis de fitoeno está pues disponible y, en la actualidad, se obtienen las primeras cosechas enriquecidas en beta-caroteno de oleaginosas de la importancia agronómica de la colza (*Brassica napus*) y de la mostaza parda (*Brassica juncea*) (15).

Los tocotrienoles y tocoferoles (vitamina E) no se sintetizan en los mamíferos, por lo que se consideran un componente esencial de su dieta. La síntesis de tocotrienol comienza con la condensación de ácido homogentísico y geranil-geranil difosfato. Se ha clonado el gen responsable de esta reacción de condensación en arroz, cebada y trigo. La expresión del gen de cebada en maíz ha servido para producir una variedad transgénica que posee seis veces más tocotrienol (16). Actualmente, se está evaluando el efecto *in vivo* de estos derivados de la vitamina E (17).

El problema de la deficiencia en hierro de la población cuya dieta se basa en el arroz se intenta aliviar mediante la obtención de variedades transgénicas de dicho cereal, que expresan los genes que codifican proteínas que acomplejan y almacenan hierro como la ferritina de judía (18). Ensayos con ratas anémicas demostraron que es posible la recuperación de la enfermedad tras veintiocho días de dieta con arroz transgénico que expresa la ferritina de judía (19).

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas que poseen propiedades funcionales entre las que destacan su capacidad antioxidante y su acción vasodilatadora. Recientemente, se ha clonado el gen de tomate que codifica la hidroxicianomil-Co A quinasa, un enzima clave para la síntesis de ácido clorogénico, flavona que previene la aparición de aterosclerosis. Dicho gen se ha expresado en múltiples copias en tomates transgénicos de manera que éstos tienen un aumento del 10 por 100 en los niveles de ácido clorogénico. Este pequeño incremento aumenta grandemente la capacidad antioxidante de los frutos (20).

Por otra parte, es sabido que las proteínas de las legumbres son deficientes en aminoácidos azufrados mientras que las de los cereales tienen bajo contenido en isoleucina y lisina. Pues bien, se ha conseguido desarrollar una variedad transgénica de arroz que sintetiza faseolina, una proteína de reserva de la judía (21). De igual manera, se ha conseguido mejorar las legumbres mediante la expresión de genes que codifican proteínas ricas en metionina provenientes de arroz, maíz, y girasol (22, 23). También es posible aumentar el nivel de lisina en patatas transgénicas mediante la introducción de genes bacterianos que codifican enzimas de la vía de biosíntesis de lisina que escapan al proceso de inhibición «feed-back» que caracteriza dicha ruta metabólica (24).

La mejora de la composición nutricional de los aceites se ha abordado por técnicas de ingeniería genética (25). En 2005, se espera la primera liberación comercial de plantas de algodón modificadas genéticamente con altos contenidos de ácidos oleico y esteárico y bajos niveles de palmitato dirigidas a la producción de margarinas (26). Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) como el ácido araquidónico y el eicosapentanoico son precursores de las prostaglandinas, participan en el desarrollo del cerebro y de la retina y se

les asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares. Los PUFA se sintetizan sólo en los mamíferos. Recientemente, se han descrito plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* capaces de sintetizar estos compuestos (27). Los mismos autores anuncian la inmediata producción de plantas transgénicas de soja capaces de producir PUFA.

Aunque sólo una pequeña parte de las aplicaciones aquí descritas y de otras muchas están próximas a incrementar la lista de alimentos transgénicos disponibles en los mercados, basta repasar el listado para ser optimistas sobre los objetivos y logros de esta segunda generación de plantas transgénicas.

EL ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE MUTANTES HOMEÓTICOS DE DESARROLLO FLORAL ABRIÓ LAS PUERTAS A LA BIOTECNOLOGÍA DE LAS FLORES Y DE LOS FRUTOS

Durante los últimos años hemos estudiado la biología del desarrollo floral en angiospermas, utilizando el análisis genético y molecular de los procesos de transición floral y de la ontogenia de flores y frutos. Este tipo de abordaje experimental ha permitido comprender en sistemas modelo, fundamentalmente *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana*, el conjunto de genes reguladores que gobiernan dichos procesos (28).

Todo comenzó con el análisis molecular de mutantes homeóticos del desarrollo floral, algunos ya observados por Goethe en su tiempo, y posteriormente, guardados celosamente en bancos de germoplasma alemanes y británicos, a pesar de la aparente inutilidad de dichos monstruos (29).

En *Antirrhinum majus* hay disponibles líneas que contienen elementos transponibles activos: los famosos genes saltarines cuyo descubrimiento le valió la obtención del Premio Nobel a Bárbara McClintock. En sus flores el fenómeno se puede visualizar observando los sectores coloreados que provoca en el pétalo el salto de uno de estos elementos, al recuperar todas las células derivadas de aquella que sufre el salto inicial, la capacidad de sintetizar pigmentos

antocianos. El número de saltos se puede aumentar cambiando las condiciones de temperatura. Este fenómeno abre la posibilidad de etiquetar genes con elementos transponibles y desvelar la identidad molecular de los genes asociados a mutaciones concretas.

En el caso del gen *Deficiens*, disponíamos de una serie alélica, lo que facilitó el análisis molecular de las mutaciones en dicho gen y de sus consecuencias. En el caso de *deficiens-globifera*, podemos observar un fenotipo correspondiente a una mutación homeótica en la que los pétalos se transforman en sépalos y los estambres se transforman en carpelo. Alteraciones fenotípicas de carácter homeótico que muestran patrones de cambio conservados se pueden observar en flores de plantas de especies distintas y por supuesto también en las flores de *Arabidopsis thaliana*, la brásica convertida en planta modelo por excelencia.

Nosotros pudimos aislar y caracterizar a nivel molecular el gen *Deficiens* que resultó ser un activador transcripcional y primer miembro descubierto de la familia de genes MADS-box, cuya D corresponde a *Deficiens* (30, 31). Mutaciones en el gen ortólogo de *Deficiens* en *Arabidopsis*, denominado *Apetala-3* causan igualmente un fenotipo de pérdida de función B consistente en las mencionadas transformaciones homeóticas en el segundo y tercer verticilos florales.

El análisis genético molecular de los mutantes homeóticos de desarrollo floral ha permitido establecer el denominado modelo ABC que explica la formación e identidad de los verticilos florales de acuerdo con tres tipos de actividades básicas, A, B y C, de forma que en el territorio donde se expresa la actividad A se forma un sépalo; A y B en el mismo lugar darán lugar a la formación de un pétalo, mientras que B y C especifican el órgano sexual masculino o estambre, y C especifica el órgano sexual femenino, el carpelo (28).

Basados en este modelo y con los genes responsables de las actividades A, B y C aislados es posible diseñar flores de *Arabidopsis* que tienen en cada verticilo la clase de órgano que deseemos. De la misma manera que el triple mutante abc tiene, como postula el modelo, todos los órganos de los verticilos de la flor transformados en hojas, hecho curiosamente ya anticipado por Goethe y que provocó hilaridad entre los científicos de su tiempo.

LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANDROESTÉRILES COMO EJEMPLO DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUCIR LAS PLANTAS DEL FUTURO

Nosotros trabajamos fundamentalmente con leguminosas, en concreto con el guisante como planta de interés agronómico; aunque también hemos desarrollado diversos programas de genética reversa como la del RNAi y el etiquetado de genes por Tnt1 de tabaco en *Medicago truncatula*, leguminosa que utilizamos como modelo experimental para estudiar la arquitectura de la planta y el desarrollo de flores y frutos (32-42).

El inicio del proyecto: la búsqueda de marcadores moleculares del desarrollo floral

Hace años nos planteamos la necesidad de producir marcadores moleculares que permitieran identificar mezclas de órganos y tejidos en mutantes homeóticos florales con transformaciones incompletas. Elegimos como alternativa la producción de anticuerpos monoclonales que reconocieran proteínas expresadas específicamente en un órgano floral (43). La estrategia, sencilla en su planteamiento y tediosa en su ejecución, pasaba por conseguir extractos de proteínas de los distintos órganos florales y sus correspondientes anticuerpos policlonales. Cada extracto proteico se sometió a inmunosustracción con los anticuerpos policlonales obtenidos contra las proteínas de los otros órganos con el fin de inmunosustraer las proteínas comunes. Con aquellas proteínas de cada extracto que no se pudieron inmunosustraer (0,2 por 100 de las iniciales), generamos anticuerpos monoclonales. Es así como obtuvimos una pequeña colección de marcadores moleculares específicos de órgano floral. Pronto llamó nuestra atención uno que habíamos denominado A1. El anticuerpo A1 reconoce una proteína que se expresa específicamente en estambres, tal y como desveló el análisis Western. Se trata de una proteína de 26 kDa que las inmunolocalizaciones muestran que está presente exclusivamente en las anteras.

Utilización del anticuerpo monoclonal A1: desde el producto génico al gen codificante *END1*

Los estambres están formados por el filamento y por la antera. Descartada la expresión en los filamentos se trataba de conocer en qué tipos celulares de las anteras se expresa el producto génico reconocido por el anticuerpo A1. Veamos, en primer lugar, la estructura de las anteras. Una sección transversal de la antera nos muestra las tres capas celulares iniciales L1, L2 y L3 del primordio estaminal y los tipos celulares a los que dan lugar en la antera madura, epidermis, endotecio, tapetum externo, tapetum interno, tejido conectivo y haz vascular que estructuran la antera en dos tecas con cuatro sacos polínicos. Disponer del anticuerpo monoclonal A1 nos permitió aislar por cromatografía de afinidad la proteína que reconoce; y aplicando técnicas de microsecuenciación, pudimos desvelar los primeros veinte aminoácidos de su extremo amino terminal. Esto hizo posible que diseñáramos una estrategia para aislar, primero, el cDNA correspondiente al gen y, luego, el DNA genómico correspondiente. La disponibilidad del cDNA nos permitió dos tipos de análisis de la expresión del gen, de tipo Northern y de hibridación *in situ*. El análisis Northern confirmó que el gen es específico de estambres y que dentro de los estambres se expresa en las anteras y no lo hace en filamento, tubo estaminal y granos de polen. Estos resultados se corroboraron y ampliaron por experimentos de hibridación *in situ* que mostraron que el gen, al que denominamos *END1*, tiene un patrón de expresión temporal desde el momento en que las primeras células adquieren la identidad de primordio estaminal hasta la dehiscencia de la antera, así como que, espacialmente, se expresa en epidermis, endotecio y tejido conectivo, esto es, en los tejidos que más contribuyen a dar soporte estructural a las anteras. Experimentos de inmunolocalización confirmaron que la proteína *END1* tiene el mismo patrón de expresión espacio-temporal que el correspondiente mRNA.

El análisis tipo Southern mostró un patrón de restricción indicativo de que el gen *END1* se encuentra como gen de copia única en el genoma del guisante.

El patrón de expresión espacio-temporal de *END1* y la funcionalidad de su región promotora en especies heterólogas sugieren su potencial uso biotecnológico

El guisante es una planta recalcitrante desde el punto de vista de la transformación genética. Por ello, decidimos realizar estudios de funcionalidad del promotor de *END1* en sistemas heterólogos como *Arabidopsis*, tabaco y tomate con dos objetivos: comprobar si la región promotora es capaz de dirigir la expresión de genes a las anteras de dichas especies y, en caso positivo, determinar la región promotora mínima.

El promotor del gen *END1* de guisante resultó ser funcional también en *Arabidopsis*, tabaco y tomate, al ser capaz de dirigir la expresión del gen delator *GUS* a la epidermis, endotecio y tejido conectivo de las anteras de plantas transgénicas de dichas especies (40).

El análisis *in silico* de la región 5' de *END1* nos permitió localizar distintos motivos o elementos presentes en otras regiones promotoras de genes específicos de anteras y, especialmente, nos llamó la atención la presencia de posibles cajas CArG, que son elementos en cis reconocidos por los factores transcripcionales codificados por los genes MADS-box.

Para caracterizar la región promotora mínima capaz de mantener el patrón de expresión espacio-temporal del gen *END1*, realizamos diversas deleciones sucesivas e internas de posibles elementos reguladores. El análisis de funcionalidad se llevó a cabo en plantas transgénicas de *Arabidopsis* utilizando como gen delator el gen *GUS* y evaluando la expresión de la correspondiente proteína colorimétricamente. A tal fin, clasificamos la expresión de *GUS* como fuerte, moderada, débil o ausente. La deleción de la zona comprendida entre los nucleótidos -685 y -426 mostró que dicha zona contiene elementos reguladores positivos. Asimismo, entre los nucleótidos -426 y -386 observamos la presencia de elementos reguladores negativos. Entre los nucleótidos -336 y -309 hay elementos imprescindibles para la expresión del gen ya que en su ausencia se pierde completamente la capacidad de dirigir la expresión de *GUS*. Estos resultados muestran que la región comprendida entre -336/-6 define la secuencia 5' de la región promotora mínima para la correcta expresión espacial y temporal del gen.

Los experimentos de deleciones internas nos llevan a concluir que en las regiones adyacentes -336/-347 y -347/-309 hay elementos con funciones redundantes para la expresión del gen. El efecto observado al eliminar la región -225/-208 desvela la existencia de un elemento represor o, alternativamente, el acercamiento de dos elementos reguladores positivos cercanos. Finalmente, la eliminación del motivo CArG contenido entre -115/-99 desvela que dicho motivo es esencial para la regulación de la expresión de *END1*. Por tanto, concluimos que *END1* podría ser un gen «diana» de los genes de identidad de órgano floral que especifican el estambre.

El patrón de expresión espacio-temporal del gen *END1* de guisante y la funcionalidad de su región promotora en otras especies nos sugirió la posibilidad de aplicar su uso a la obtención de plantas androestériles.

La producción de plantas de cosecha híbridas, clave para aumentar la cantidad y la calidad de los alimentos

Biotecnológicamente, es posible utilizar estrategias de ingeniería genética para producir la ablación celular. Para ello, es necesario disponer de un promotor que pueda dirigir la expresión de un agente citotóxico en las células que se pretenden destruir y contar con un sistema de transformación genética eficaz para la especie o variedad deseada. Ejemplos de agentes citotóxicos empleados son diversas proteasas, lipasas, RNasas, toxinas como DTA y la exotoxina A entre otros. Nosotros seleccionamos el gen de la barnasa, una ribonucleasa de *B. amyloliquefaciens* para el que se dispone de otro gen que codifica el barstar, que es un inhibidor específico de la barnasa.

Si se reprodujera el patrón de expresión del gen *END1* en el guisante en otras especies, una planta transgénica que porte una construcción pEND1::barnasa comenzaría a expresar el gen citotóxico en las células parietales primarias, lo que afectaría a la diferenciación de las células esporógenas y produciría de manera eficaz plantas con esterilidad masculina.

La producción de líneas vegetales puras con esterilidad masculina garantiza la posibilidad de producir híbridos mediante cruces

dirigidos. Recordemos que los híbridos se caracterizan por un fenómeno no comprendido a nivel molecular conocido con el nombre de heterosis y que los hace ser más vigorosos y productivos que las líneas puras parentales. De hecho, la utilización de híbridos fue una de las bases de la segunda Revolución Verde. Si las líneas parentales femeninas son androestériles porque expresan en las anteras el gen de la barnasa, la fertilidad en los híbridos se podría restaurar si la línea parental masculina expresara en los mismos tejidos de la antera el gen *barstar*, que es su inhibidor específico.

La construcción *pEND1::barnasa* produce plantas transgénicas androestériles de *Arabidopsis*, tabaco, tomate y colza

La expresión del gen de la barnasa dirigida por el promotor del gen *END1* de guisante en plantas de *Arabidopsis* tiene como consecuencia la producción de plantas androestériles, siendo posible aislar líneas con 100 por 100 de androesterilidad. No se producen otros efectos fenotípicos, excepto que las plantas son más longevas y producen un mayor número de flores. De hecho, se puede observar que los estambres de las plantas transgénicas son más cortos que los silvestres ya que sus filamentos sólo alcanzan una longitud de la tercera parte de la esperada. Además, las anteras presentan malformaciones evidentes y los tipos celulares de su superficie recuerdan más a los tipos del filamento que a las células estrelladas de la superficie de las anteras.

Para comprobar la posibilidad de restaurar la fertilidad de la descendencia híbrida, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* y se seleccionaron plantas homocigotas para el transgén *barstar*. Se realizó un cruce entre una planta de una línea hemicigota *END1::barnasa* y una planta de una línea homocigota *END1::barstar* y se estudió su descendencia.

Se pudo observar el efecto esperado si el inhibidor es capaz de impedir la acción de la barnasa. La descendencia mostraba estambres normales y fertilidad restaurada. Por tanto, concluimos que es posible utilizar un abordaje de ingeniería genética basado en las características del promotor del gen *END1* de guisante para producir

semillas híbridas. Este procedimiento fue objeto de una patente internacional adquirida por la empresa NewBiotechnic (44).

De igual manera, si comparamos plantas transgénicas de tabaco que expresan en anteras el gen de la barnasa con las correspondientes silvestres, se observa una mayor longevidad y una mayor producción de flores en las transgénicas. El fenotipo de las anteras transgénicas mostraba una malformación que les da aspecto de punta de flecha. Si observamos las anteras por microscopía electrónica de barrido concluimos que las anteras transgénicas, además de deformadas externamente, carecen de granos de polen en su interior, aspecto este último también visible por microscopía óptica en cortes transversales de las anteras.

En las plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen de la barnasa en sus anteras son incluso más llamativos los efectos de longevidad y la mayor producción de número de flores que lo eran en *Arabidopsis*.

Las plantas transgénicas de tomate cv. Microton pEND1::*barnasa* mostraban malformaciones en la anteras ya que no forman correctamente el cono estaminal capaz de mantener encerrado al carpelo. Las plantas con los fenotipos más extremos permiten observar a simple vista el ovario con el estilo y el estigma.

En secciones transversales de tomate se puede comprobar como la construcción pEND1::*GUS* es capaz de expresar GUS en la epidermis, endotecio y tejido conectivo de las anteras de plantas transgénicas, mientras que la construcción pEND1::*barnasa* produce malformaciones severas que impiden el correcto desarrollo de los sacos polínicos.

El potencial biotecnológico del promotor pEND1 se extiende a la producción de frutos partenocárpico en tomate y a la modificación de monocotiledóneas de alto valor agronómico como arroz y trigo

La ablación de las anteras en plantas transgénicas de tomate induce el desarrollo de frutos partenocárpico. Hasta ahora, la partenocarpia en tomate se había observado en algunas mutaciones

homeóticas como las de pérdida de función B, es decir, en flores en los que los pétalos se han transformado en sépalos y los estambres se han transformado en carpelo, por lo que se había planteado la posibilidad de que la ausencia de estambres estuviera relacionada con el desarrollo de frutos partenocárpicos. Sin embargo, la emasculación o eliminación manual de los estambres no induce partenocarpia en los frutos. Estos experimentos constituyen la primera prueba inequívoca de que la eliminación de los estambres en los estadios iniciales de su desarrollo es suficiente para provocar la partenocarpia. Probablemente, los estambres producen un inhibidor del desarrollo del fruto que se formaría por defecto en ausencia del mismo. En la actualidad, estamos llevando a cabo el análisis genético molecular de los frutos partenocárpicos con objeto de desvelar el gen o los genes implicados en el desarrollo partenocárpico de frutos.

Este procedimiento de ingeniería genética ha sido objeto de patente (45), cuyos derechos han sido adquiridos por la empresa New-Biotechnic.

Por un lado, la producción de frutos sin semillas es de mucho interés para los agricultores puesto que permite cultivar el tomate y producir frutos fuera del margen de temperaturas en el que la formación de granos de polen es viable; por otro lado estos frutos también son de interés para los industriales de producción de sopas, pastas y salsas de tomate porque les permite suprimir la etapa de filtrado de la pulpa para eliminar las semillas ya que su presencia termina por transmitir sustancias que perjudican el sabor y el valor nutritivo de los productos. Los frutos sin semillas también son apreciados en tecnología culinaria al tiempo que son preferidos por un sector de los consumidores.

Si observamos el interior de los frutos de tomate podemos comprobar el correcto desarrollo de los frutos transgénicos cuya única diferencia con los frutos silvestres es la ausencia de semillas. La maduración de los tomates partenocárpicos es normal y culminan su desarrollo presentando sus lóbulos rellenos de pulpa de un color rojo intenso. En la actualidad, estamos realizando experimentos con cultivares comerciales de tomate con objeto de valorar la productividad de las plantas transgénicas y las características y composición nutricional de los frutos.

Por otra parte, la empresa NewBiotechnic, en colaboración con el consorcio alemán Centrum für Grüne Gentechnik DLR, ha comprobado que la tecnología para producir plantas androestériles es eficaz asimismo en colza. Las flores con fenotipo intermedio o severo en la malformación de las anteras resultaron ser androestériles. También estamos desarrollando, en colaboración con otros laboratorios, estudios de funcionalidad del promotor del gen *END1* de guisante en otras especies de interés agronómico con objeto de comprobar la viabilidad de utilizarlo para dirigir la expresión de genes foráneos a los estambres de dichas especies. Así, en colaboración con investigadores del IRTA, hemos producido plantas transgénicas pEND1::*GUS* de arroz. Hemos podido comprobar la expresión de GUS específicamente en las anteras y las lodículas de la flor de arroz. De igual manera, en colaboración con investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba, hemos podido confirmar que el promotor pEND1 es también funcional en trigo.

CONCLUSIÓN

He pretendido mostrar alguna de las posibles aplicaciones de la ingeniería genética para mejorar las plantas cultivadas derivadas de nuestro trabajo sobre la biología del desarrollo floral. Algunas de ellas, como la producción de híbridos, la producción de frutos partenocárpicos o la disponibilidad de un método para evitar la transferencia horizontal indeseada de genes son ya una realidad, mientras que otras, como el aumento del número de flores por planta, la obtención de plantas con flores más resistentes a las bajas temperaturas o al estrés hídrico o la modificación de la distribución de energía para favorecer el desarrollo de las partes vegetativas están todavía en fase de experimentación.

Quisiera llamar la atención sobre varios aspectos de este trabajo. En primer lugar, que las aplicaciones surgen como consecuencia de la observación de unos resultados que inicialmente nos planteamos desde una perspectiva básica: disponer de marcadores moleculares para identificar células y tejidos florales, corroborando una vez más que no hay la ciencia básica y la aplicada sino la Ciencia y sus aplicaciones.

En segundo lugar, merece especial atención el hecho del amplio espectro de especies en el que el promotor pEND1 es funcional; funcionalidad que traspasa el límite entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Esta característica podría dar la imagen falsa de que, una vez aislado un promotor, su utilización funcional es generalizable a las distintas especies y variedades de interés agronómico. ¡Nada más lejos de la realidad! De la misma manera que para evitar falsas expectativas, hay que recordar la existencia de numerosas especies y variedades recalcitrantes a la transformación genética, hecho este que limita el número de aplicaciones posibles en la actualidad.

EPÍLOGO

En este trabajo he pretendido mostrar, a partir de trabajos desarrollados en mi laboratorio, algunos aspectos del «estado del arte» de los avances tecnológicos que comienzan a permitir la modificación dirigida de las plantas con objeto de producir compuestos útiles para la nutrición adecuada y la buena salud de las personas. Es de esperar que los recientes avances en tecnologías «ómicas» ayuden a diseñar nuevas estrategias en los próximos años.

La tradicional búsqueda, aislamiento y uso de compuestos de interés nutricional y farmacológico entre los productos naturales de las plantas se complementa ahora con la utilización de las plantas como biofactorías en un campo científico-técnico emergente: la Agricultura molecular. En este contexto, la Ingeniería Genética se presenta como llave o clave para abrir las puertas de dicha disciplina y conviene recordar que las llaves pueden ser útiles para abrir puertas y acceder a nuevos caminos. Sin embargo, al abrir estas puertas es necesario hacer una valoración adecuada de los beneficios y riesgos que estos abordajes conllevan (11). Pienso que los beneficios son claros.

Respecto de los riesgos, se suelen resumir en riesgos para la salud por el consumo de organismos modificados genéticamente y riesgos para el medio ambiente. No existiendo el «riesgo cero» en ninguna tecnología, me atrevería a aseverar que, desde el punto de vista de la salud y la nutrición, los alimentos transgénicos son los alimentos más seguros de los que nunca haya dispuesto la humanidad.

Respecto de los riesgos medioambientales, sin que se puedan generalizar, convendría realizar un análisis exhaustivo, caso por caso.

En mi humilde opinión, añadiría un nuevo riesgo que deberíamos evitar: «el riesgo de no desarrollar las capacidades para mejorar las propiedades de las plantas», es decir, que un riesgo importante de los transgénicos consiste en no hacerlos. En nuestro país, algunos colegas han visto recientemente cómo el fundamentalismo de unos pocos se tornaba en destrucción, delictiva, de sus campos experimentales en los que se crecían, legalmente, cosechas de plantas mejoradas biotecnológicamente para contribuir a desarrollar una agricultura menos contaminante. Pienso que entre todos debemos conseguir que los científicos de este campo, también los españoles, no tengan que identificarse con el famoso «grafitti» de Bogotá que decía: «Y cuando sabíamos la respuesta... nos cambiaron la pregunta».

AGRADECIMIENTOS

La realización de los trabajos aquí descritos no hubiera sido posible sin la participación de numerosas personas, entre las que hay que destacar a Luis Cañas, María Dolores Gómez, Edelín Roque, Cristina Ferrándiz y Francisco Madueño. También hay que destacar el excelente trabajo de los técnicos Teresa Caballero y Mari Cruz Rochina, y el cuidado de las plantas en el invernadero de Rafael Martínez Pardo y Antonio Villar. Asimismo estos trabajos han sido financiados parcialmente por diferentes proyectos de la UE (Bridge PL89004) de convocatorias públicas estatales (CICYT BIO97-0583; BIO2000-0940; BIO2003-01171) y de la Generalitat Valenciana (GV 03/66).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FOLCH, G. (1986) *Historia General de la Farmacia. El medicamento a través del tiempo*. Ediciones Sol. Madrid. ISBN 84 86624 00 2.
- (2) GARCÍA OLMEDO, F. (1998) *La Tercera Revolución Verde. Plantas con luz propia*. Ed. Debate, Madrid.
- (3) FAO. (2004) *The State of Food and Agricultura: Agricultural Biotechnology, meeting the needs of the poor?* 209 pp. ISBN 92 5 105079 1.

- (4) EUROPEAN COMMISSION. (2004) Position paper: Plants for the Future. 22 pp.
- (5) GEWIN, V. (2004) Organic FAQs. *Nature* 428: 796-798.
- (6) MACILVAIN, C. (2004) Organic: Is it the future of farming? *Nature* 428: 792-793.
- (7) GARCÍA OLMEDO, F. (2004) Ortorexia: la obsesión por los alimentos naturales. *Revista de Libros* n.º 96, pp. 26-27. Diciembre 2004.
- (8) RAMÓN, D. (1997) *Los genes que comemos*. Ed. Bromera. Alzira. Valencia.
- (9) PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; PÉREZ-SANJUÁN, A.; GARCÍA-FERRIZ, L.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an *in vivo* marker. *Molecular Breeding* 14: 419-427.
- (10) CHRISPEELS, M. J.; SADAVA, D. E., eds. (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Jones and Bartlett Pub. EEUU. ISBN 0 7637 1586 7.
- (11) BELTRÁN, J. P. (2003) Transgénicos o no Transgénicos ¿es esa la cuestión? En *Cognitio atque Inventio*. Ed. Agustín Andreu. Colección Leibnizius Politechnicus n.º 5, pp. 93-110. Aula Atenea de Humanidades. Universidad Politécnica de Valencia. ISBN: 84-9705-301-X.
- (12) FISCHER, R.; SCHILLBERG S. (2004) *Molecular Farming. Pharmaceuticals and Technical Proteins*. John Wiley & Sons Ed. ISBN 3527307869.
- (13) YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. (2000) Engineering the provitamin A (B-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- (14) BEYER, P.; AL-BABILI, S.; YE, X.; LUCCA, P.; SCHAUB, P.; WELSCH, R.; POTRIKUS, I. (2002) Golden Rice: introducing the b-carotene biosíntesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. Abstracts Symposium Plant Breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition 506S-510S.
- (15) MACKAY, M. (2002) The application of biotechnology to nutrition: an overview. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21:157S-160S.
- (16) CAHOON, E. B.; HALL, S. E.; RIPP, K. G.; GANZKE, T. S.; HITZ, W. D.; COUGHLAN, S. J. (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21: 1082-1087.
- (17) DORMAN, P. (2003) Corn with enhanced antioxidant potential. *Nature Biotechnology* 21: 1015-1016.
- (18) LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I. (2002) Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 184S-190S.
- (19) MURRAY-KOLB, L. E.; TAKAIWA, F.; GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; THEIL, E. C.; BERAD, J. L. (2002) Transgenic rice is a source of iron for iron- depleted rats. *J. Nutrition* 132: 957-960.
- (20) NIGGEWEG, R.; MICHAEL A. J.; MARTIN, C. (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22: 746-754.
- (21) ZHENG, Z.; SUMI, K.; TANAKA, K.; MURAI, N. (1995) The bean seed B-phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plant Physiol.* 109: 777-786.

- (22) ALTENBACH, S. B.; SIMPSON, R. B. (1990) Manipulation of methionine-rich protein genes in plant seeds. *Trends in Biochemistry* 8: 156-160.
- (23) DE CLERQ A.; VANDEWIELE, M.; VAN DAMME, J.; GUERCHE, P.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKOVE, J.; KREBBERS, E. (1990) Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants. *Plant Physiol.* 94: 970-979.
- (24) SEVENIER, R.; VAN DER MEER, I. M.; BINO, R.; KOOPS, A. J. (2002) Increased production of nutriment by genetically engineered crops. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 199S-204S.
- (25) KIDNEY, A. J. (1996) Designer oils for better nutrition. *Nature Biotechnol* 14: 946.
- (26) LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. (2002) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J. Amer. Coll. Nutrition* 21: 205S-211S.
- (27) QI, B.; FRASER, T.; MUGDORF, S.; DOBSON, G.; SAYANOVA, O.; BUTLER, J.; NAPIER, J. A.; STOBART, A. K.; LAZARUS, C. M. (2004) Production of very long Caín polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnol.* 22: 739-745.
- (28) WEIGEL, D.; MEYEROWITZ, E. M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 7: 203-209.
- (29) GOETHE, J. W. (1790) Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. C. W. Ettinger, Gotha.
- (30) SOMMER, H.; BELTRÁN, J. P.; HUIJSER, P.; PAPE, H.; LÖNING, W. E.; SAEDLER, H.; SCHWARZ-SOMMER, Z. S. (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein has homology to transcription factors. *EMBO J.* 9: 605-613.
- (31) NACKEN W. K. F.; HUIJSER, P.; BELTRÁN, J. P.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. (1991) Molecular characterization of two stamen-specific genes, *tap1* and *fil1*, that are expressed in the wild type, but not in the *deficiens* mutant of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 129-136.
- (32) BELTRÁN, J. P. (1991) A flourishing time for flower development. *The New Biologist* 3: 667-670.
- (33) GARCÍA MARTÍNEZ, J. L.; BELTRÁN, J. P. (1992) Interaction between vegetative and reproductive organs during early fruit development in pea. In *Progress in Plant Growth Regulation*. C. M. Karssen, L. C. Van Loon, D. Vreugdenhil Eds. pp. 401-410, Kluwer Acad. Publ.
- (34) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BELTRÁN, J. P. (1995) Repression of the pea lipoxygenase gene *loxg* is associated with carpel development *Plant Mol. Biol.* 27: 887-899.
- (35) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P. (1996) Immunolocalization of lipoxygenase in pea (*Pisum sativum* L.) carpels. *Plant Cell Rep.* 15: 620-626.
- (36) BELTRÁN, J. P.; FERRÁNDIZ, C.; GÓMEZ, M. D.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; PÉREZ, A.; NAVARRO, C.; CAÑAS, L. (1996) The use of homeotic mutants to study flower development in *Pisum sativum* L. *Flowering Newsletter* 22: 41-48.

- (37) FERRÁNDIZ, C.; NAVARRO, C.; GÓMEZ, M. D.; CAÑAS, L.; BELTRÁN, J. P. (1999) Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Dev. Genet.* 25: 280-290.
- (38) RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; PÉREZ-GARCÍA, A.; BELTRÁN, J. P. (2001) Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea. *Plant Mol. Biol.* 46 (4): 373-382.
- (39) BERBEL, A.; NAVARRO, C.; FERRÁNDIZ, C.; CAÑAS, L. A.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P. (2001) Analysis of *PEAM4*, the *API* functional homologue, supports a model for *API*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *The Plant Journal* 25 (4): 441-451.
- (40) BELTRÁN, J. P.; GÓMEZ, M. D.; ROQUE, E.; MADUEÑO, F.; CAÑAS, L. A. (2002). Biotechnological potential of *End1*, a gene specifically expressed in pea anthers. In Standardisation Diseases Resistances Screening in Grain Legumes Germplasm Banks. Ed. A. Ramos and R. Laguna, pp. 33-36. JCL Valladolid. ISBN 84-606-3195-8. C. L.
- (41) BENLLOCH, R.; NAVARRO, C.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2003) Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sexual Plant Reproduction* 15: 231-241.
- (42) GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta* 219: 967-981.
- (43) CAÑAS, L. A.; ESSID, R.; GÓMEZ, M. D.; BELTRÁN, J. P. (2002) Monoclonal antibodies as developmental markers to characterize pea floral homeotic transformations. *Sexual Plant Reproduction* 15 (3): 141-152.
- (44) GÓMEZ, M. D.; CAÑAS, L. A.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P. (2000) Título de la patente: Sequence regulating the anther-specific expression of a gene and its use in the production of androsterile plants and hybrid seeds. N.º de solicitud: P200000814. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31/05/2000. Entidad titular: CSIC-NewBioTechnic. Países a los que se ha extendido: todo el mundo. PCT/ESO1/00127. Empresa/s que la están explotando: NewBioTechnic.
- (45) ROQUE E.; ELLUL P.; GÓMEZ, M. D.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J. P.; CAÑAS, L. A. (2004) Título: Tomates partenocárpicos y procedimiento para su producción. N.º de solicitud: P200401761. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 17/07/2004. Entidad titular: CSIC-NewBioTechnic. Países a los que se ha extendido: PCT en trámite. Empresa/s que la están explotando: NewBioTechnic.

¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? *

CONSUELO BOTICARIO BOTICARIO
*Académica Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad tan antigua como la vida en nuestro planeta. Prueba de ello son los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas de Perú y Egipto. Documentos que datan del 2000 al 1500 a.C. como el Ramayana de la India o el Papiro de Egipto Ebers, hacen referencia a este padecimiento. Su nombre, cáncer, se inspiró en la observación de los tumores de mama que al crecer toman la forma de un cangrejo (Galeno, 131-203 d.C., en su tratado *Definitionis Medicae*). Podemos decir que desde el inicio de la vida en nuestro planeta los seres vivos se han expuesto a agentes ambientales físicos, químicos y biológicos potencialmente cancerígenos a los que se suman hoy en día algunos productos industriales sintéticos capaces de generar cáncer.

¿ES EL CÁNCER UNO O MÚLTIPLES PADECIMIENTOS?

El cáncer engloba una gran variedad de padecimientos que tienen como denominador común la proliferación celular incontrolada. Partiendo del análisis de estudios epidemiológicos realizados en EE.UU., se ha llegado a la conclusión de que más del 80 por 100 de las muertes por cáncer pueden ser atribuidas a factores ambientales. Entre ellos destaca el tabaco con un 33 por 100, el alcohol un 3 por 100, y la alimentación otro 33 por 100. Se puede afirmar que el cáncer es una enfermedad que podría prevenirse con medidas relacionadas con estos factores.

* Revisión realizada con motivo de la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, día 18 de marzo de 2004.

Para profundizar en el conocimiento científico sobre las relaciones entre la dieta y el cáncer se requieren amplios estudios epidemiológicos combinados con importantes estudios de laboratorio, incluyendo marcadores bioquímicos y de susceptibilidad genética. La dieta adecuada unida al ejercicio físico, los controles periódicos y los hábitos saludables de vida pueden tener una gran importancia preventiva, si bien en el caso del cáncer de pulmón, la prioridad es el abandono del tabaco. Hay que tener en cuenta que la ingesta conlleva la interacción de sus componentes entre sí y con otros factores genéticos y ambientales. La complejidad de la interacción entre componentes dietéticos y el metabolismo de los mismos ha de tenerse en cuenta en el abordaje analítico de los resultados de los estudios sobre dieta y cáncer.

Son muchos los tipos de cáncer que parecen estrechamente relacionados con la alimentación de cada día; aunque no es el único factor causal a tener en cuenta, sí es realmente importante.

Palabras clave: Nutrición.—Prevención.—Cáncer.

SUMMARY

Can a healthy diet prevent cancer?

Cancer is an illness as old as life on our planet. Proof of this statement are the tumours found in the bones of dinosaur fossils or in the human mummies of Peru and Egypt. Documents dating from 2,000 to 1,500 BC like the Ramayana from India or the Papiro from Egypt Ebers, refer to this illness. It's name cancer, was inspired by the observing of breast tumours, which as they grow take on the shape of a crab (Galeno, 131-203 AC in his treatise *Definitions Medicae*). It can be said that from the beginning of life on our planet human beings have been exposed to physical, chemical and biological agents which are potentially cancerigenous to which nowadays we can add some other synthetic products capable of causing cancer.

IS CANCER ONE OR MANY ILLNESSES?

Cancer involves a great variety of illnesses with a common factor: the uncontrolled development of cells. Starting from the analysis of epidemiological studies done in the USA we have reached the conclusion that more than 80 por 100 of deaths caused by cancer are related to environmental factors. Among them smoking stands out with 33%, followed by alcohol with 3% and diet 33%. It can be said that cancer is an illness which could be prevented by taking measures related to these factors. To study in depth scientific knowledge about the way diet and cancer are related would require extensive epidemiological studies together with important laboratory studies including biochemical markers and genetic susceptibilities. A suitable diet combined with physical exercise, periodic controls

an a healthy life style could be of great preventive importance, and in the case of lung cancer, the priority is, of course, giving up smoking. It must be taken into account that ingestion involves the interaction of its components and other genetic and environmental factors. The complexity of the interaction between dietetic components and their metabolism must be taken into account when analysing the results of the studies on diet and cancer.

There are many kinds of cancer which seem to be closely related to the day-to-day diet. Although it is not the only causal factor to be borne in mind, it is, of course, of prime importance.

Key words: Nutrition.—Prevention.—Cancer.

¿UNA ALIMENTACIÓN SANA PUEDE PREVENIR EL CÁNCER?

El cáncer es una enfermedad tan antigua como es la vida en nuestro planeta. Prueba de ello son los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas descubiertas en Perú y Egipto. Documentos que datan del 2000 al 1500 a.C., como el Ramayana de la India o el Papiro de Egipto, hacen referencia a este padecimiento. Su nombre, cáncer, se inspiró en la observación de los tumores de mama que al crecer toman la forma de un cangrejo.

Sabemos que el cáncer puede ser ocasionado por agentes físicos, químicos y biológicos; algunos de ellos han acompañado al ser humano desde que apareció en el planeta, como la luz ultravioleta solar o las radiaciones ionizantes naturales. Otros han sido generados por nuestras propias actividades domésticas, tal como sucede con los hidrocarburos policíclicos liberados al calentar o cocinar con fuego de leña o carbón. Algunos vegetales, que son nuestra fuente de sustento, nos exponen a plaguicidas naturales cancerígenos (estragol y safrol), o bien otros compuestos inductores de cáncer como las aflatoxinas, que producen mohos que los contaminan.

Los seres humanos nos exponemos hoy en día a un sinnúmero de productos industriales sintéticos que se han añadido a los de origen natural y que consumimos en forma de aditivos de alimentos. También el ambiente está contaminado de plaguicidas y fertilizantes.

Podemos decir que desde el inicio de la vida del hombre en nuestro planeta los seres vivos se han expuesto a agentes ambienta-

les físicos, químicos y biológicos potencialmente cancerígenos a los que se suman hoy en día algunos productos industriales sintéticos capaces de generar cáncer.

El posible origen ambiental del cáncer fue sugerido, hace ya más de 200 años, por unos estudios realizados en Inglaterra en desholliadores, en los que se descubrió una forma rara de tumor que se asoció con el contacto continuo durante años con el hollín.

Por otra parte, múltiples observaciones desde hace más de 100 años, dan cuenta de una posible relación del cáncer con trastornos hereditarios.

¿ES EL CÁNCER UNO O MÚLTIPLES PADECIMIENTOS?

Bajo la palabra cáncer se engloban distintas enfermedades que varían en sus manifestaciones clínicas y en su respuesta a las medidas terapéuticas, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes.

El cáncer engloba una gran variedad de padecimientos que tienen como denominador común la proliferación celular incontrolada.

Se han descrito más de 100 formas distintas de cáncer. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90 por 100 de los cánceres y que se generan en los epitelios. Por lo general, estos tumores ocurren en edad avanzada y pueden incrementarse hasta 1.000 veces entre los veinte y los sesenta años. Entre ellos los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, al cuello uterino y a las mamas. Las leucemias y linfomas se producen a partir de las células formadoras de la sangre que residen en la médula ósea y en los tejidos linfáticos y aunque son menos frecuentes que los carcinomas causan un mayor impacto social y económico, pues afectan a niños y jóvenes, reduciendo su esperanza de vida y productividad.

El incremento de la esperanza de vida hace que un mayor número de individuos pueda manifestar esta enfermedad. El cáncer es hoy día una de las cinco primeras causas de defunción en países desa-

rollados y se calcula que cada año mueren en el mundo cerca de 4.300.000 personas a causa de esta enfermedad.

Sin embargo, se ha observado que las formas predominantes de cáncer varían de un país a otro. Así por ejemplo, en EE.UU. los tipos más comunes de cáncer son los de pulmón, intestino grueso y mama, en tanto que en Méjico predominan en los hombres las leucemias, linfomas, los cánceres de próstata, pulmón y estómago, y en la mujer el cáncer de cuello uterino y de mamas.

Prácticamente en todos los países el cáncer de pulmón tiende a aumentar, mientras que el de estómago parece disminuir.

Los tumores cancerosos constituyen agrupaciones de células que adquieren un comportamiento anormal de la capacidad de dividirse y dejan de respetar las reglas del organismo para lograr un desarrollo armonioso del cuerpo humano.

El cambio de una célula normal a una cancerosa no parece tener lugar en un solo paso, sino que, al contrario, se produce por etapas. Al principio esas alteraciones se conocen como metaplasias y displasias. Sin embargo, el crecimiento de esas células alteradas puede acentuarse y dar lugar a un tumor localizado, que si no invade a los tejidos vecinos se considera benigno. Si por el contrario esas células traen consigo una proliferación ilimitada que se extiende hacia los tejidos aledaños dan lugar a los tumores malignos o cancerosos y además, si esas células hacen que se desprendan otras que viajan a través del torrente sanguíneo para ir a anidarse a otros órganos forman nuevos tumores o metástasis.

El crecimiento en etapas de los tumores cancerosos ofrece la oportunidad de poder, en un momento, interferir en su crecimiento, aliviando a los pacientes y evitando su muerte. De ahí la importancia de la medicina preventiva, como efectuar por lo menos una mamografía en mujeres cada tres años, o autoexaminarse para detectar oportunamente pequeños nódulos. En la actualidad se calcula que el 50 por 100 de los pacientes con cáncer que reciben tratamiento adecuado en las etapas iniciales terminan curándose.

Partiendo del análisis de resultados de estudios epidemiológicos realizados en EE.UU., se ha llegado a la conclusión de que más del 80 por 100 de las muertes por cáncer pueden ser atribuidas a facto-

res ambientales. Entre ellos destaca el tabaco, al que se le atribuyen aproximadamente un 33 por 100 de las muertes, al alcohol un 3 por 100, y a la alimentación otro 33 por 100.

A la vista de ello se puede afirmar que el cáncer es una enfermedad que podría ser previsible con medidas relacionadas con estos factores.

La primera evidencia sobre la relación alimentación y cáncer proviene de estudios experimentales en animales realizados en la década de los cuarenta. Más tarde se realizaron numerosos estudios ecológicos y de migraciones humanas que mostraron que la incidencia y la mortalidad del cáncer de mama, colorrectal y próstata están correlacionados positivamente con los alimentos más típicamente consumidos en las sociedades occidentales, como las grasas de origen animal y los azúcares refinados, y negativamente con el consumo de alimentos vegetales como legumbres, cereales y fibra vegetal.

Sin embargo, hasta épocas más recientes no ha habido evidencias científicas como, por ejemplo, la realización de estudios randomizados, donde se ha comprobado que en una segunda generación, los japoneses emigrados a EE.UU. desarrollaban cáncer de colon tras cambiar el tipo de alimentación.

A finales de los años sesenta se empezó a disponer de los datos de registros de cáncer de base poblacional y de estudios epidemiológicos analíticos que confirmaron las grandes variaciones que había en la incidencia de cánceres claramente asociados con carcinógenos ambientales y factores relacionados con hábitos y estilos de vida, como el caso de los cánceres de pulmón, hígado y vejiga. La variación en la incidencia de dichos tumores podría, en parte, ser explicada por la variación en la exposición al tabaco, alcohol, agentes biológicos como el virus de la Hepatitis B o algunos cancerígenos ocupacionales. En cambio para otros tumores como los de mama, próstata, endometrio, colon, recto, y hasta cierto punto, el cáncer de estomago, no se ha identificado nunca una relación clara con carcinógenos biológicos, físicos y químicos. Las evidencias científicas indican que estos tumores pueden estar relacionados con la dieta y con otros factores metabólicos, antropométricos y hormonales.

Varias comisiones cualificadas de expertos internacionales han revisado las evidencias acumuladas sobre la relación de la **dieta con el cáncer** y en sus respectivos informes llegaron a las mismas conclusiones. Respecto a la composición de la dieta concuerdan en que la asociación más claramente establecida es la existente entre el alto consumo de vegetales y frutas y la reducción del riesgo de varios cánceres, especialmente del aparato digestivo y respiratorio (cánceres de boca, faringe, laringe, esófago, estómago y pulmón). También un menor riesgo de cáncer colorrectal se asocia al elevado consumo de vegetales, aunque la relación no es tan clara en el caso de frutas.

La lista de alimentos que han sido claramente identificados como asociados a un incremento del riesgo de cáncer es más reducida; se limita al alcohol, que incrementa el de cáncer de boca, faringe, laringe, esófago e hígado, y al pescado salado que aumenta el riesgo de cáncer de nasofaringe. Además el consumo frecuente de carnes rojas se asocia con un incremento del riesgo de cáncer colorrectal, mientras que una dieta rica en sal aumenta el riesgo de cáncer de estómago.

En cuanto al efecto protector de frutas y verduras y el de otros factores alimentarios, dichos informes coinciden en un punto importante y es su beneficio para algunos tipos de cánceres. Basados en estudios epidemiológicos se deducen dos conclusiones principales:

En primer lugar no existen suficientes bases científicas que justifiquen, en general, la utilización de suplementos vitamínicos para la prevención del cáncer, aunque dichos suplementos contengan una amplia y variada combinación de vitaminas y minerales abundantes en vegetales y frutas.

En segundo lugar es necesario investigar con detenimiento los mecanismos biológicos y la relación entre los vegetales, frutas y otros alimentos y el proceso de cancerogénesis.

Actualmente existe un interés creciente por conocer la reacción entre el riesgo de cáncer y las características antropométricas como el índice de la masa corporal (IMC) y la actividad física.

En varias investigaciones se ha observado que un índice de masa corporal elevado aumenta el riesgo de cánceres, como pueden ser los de mama en mujeres post menopáusicas.

Para profundizar en el conocimiento científico sobre las relaciones entre la dieta y el cáncer se requieren amplios estudios epidemiológicos combinados con importantes estudios de laboratorio, incluyendo marcadores bioquímicos y de susceptibilidad genética. Esta elección hizo la Agencia Internacional para la investigación sobre el cáncer cuando decidió dar prioridad, en lo que se refiere a la investigación sobre el cáncer y nutrición, al desarrollo de estudios prospectivos con muestras de sangre recogidas en personas sanas.

El estudio prospectivo europeo sobre dieta, cáncer y salud (EPIC) se inició en 1993 con la recogida de muestras de sangre en 22 centros de nueve países: Dinamarca, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Holanda, España, Suecia y el Reino Unido.

En España se realiza con la participación de la Consejería de Sanidad y Servicios Sociales del Principado de Asturias, la Delegación de Salud de Guipúzcoa del Gobierno Vasco, la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia, el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y la Escuela Andaluza de Salud Pública de Granada.

El estudio ha sido promovido y es parcialmente financiado por el Programa de Europa contra el Cáncer de la Unión Europea.

El estudio prospectivo sobre dieta, cáncer y salud fue diseñado con el doble objetivo de mejorar el conocimiento científico sobre factores nutricionales implicados en el desarrollo del cáncer y como consecuencia poder aportar las bases científicas para intervenciones de salud pública dirigidas a promover una dieta y estilos de vida saludables.

Una de sus grandes ventajas es el amplio rango de variabilidad de consumo como consecuencia de las grandes diferencias todavía observadas entre la dieta mediterránea de Grecia, el sur de Italia y España, y los patrones dietéticos del norte de Europa.

Entre 1990 y 1993 se desarrolló la fase piloto del proyecto, en la que se realizaron una serie de estudios sobre los métodos para evaluar la dieta y la recogida de datos del cuestionario y de las muestras de sangre. Dichos estudios aportaron una valiosa información para la elaboración del protocolo final. A partir de ellos se adoptaron tres métodos distintos de medición de la dieta mejor adaptados a la realidad de cada país.

- Cuestionarios dietéticos autoadministrados, con datos sobre 350 ítems de alimentos por país. Este método fue utilizado por siete países.
- Cuestionarios dietéticos mediante entrevistas, muy similares en contenidos a los anteriores e introducidos directamente en formatos informatizados. Este método se utilizó en los cinco centros de España mediante un programa informático específicamente diseñado «NUTRIDDIET».
- Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos combinados con un registro del consumo de una semana. Este método se utilizó en los centros ingleses.

Entre 1992 y 1998 se realizó la fase de reclutamiento. Los participantes del estudio son personas sanas de ambos sexos provenientes de diversos orígenes sociales según los países: población general, donantes de sangre, afiliados a mutuas, etc. Las personas seleccionadas fueron invitadas por cartas a participar en el estudio. Firmaron un documento manifestando su consentimiento y completaron los cuestionarios de dietas y otros factores no alimentarios (hábitos personales, estilos de vida, antecedentes médicos y quirúrgicos). En algunos centros, como en España, esta información se obtuvo mediante entrevistas personales. Finalmente se invitaba a los participantes a acudir al Centro de estudios prospectivos sobre dieta, cáncer y salud, para la extracción de sangre, obtención de medidas antropométricas (estatura, peso, talla sentado, diámetros de cintura y cadera) y revisar y completar los cuestionarios si era necesario.

Ha sido el estudio de este tipo más amplio realizado en el mundo, pues los participantes en total fueron 482.948, de los que se dispone de 377.348 muestras de sangre para futuros análisis de laboratorio. La información de la dieta mediante el recuerdo de 24 horas se obtuvo en una submuestra de 35.955, que corresponde aproximadamente al 8 por 100 del total. Los participantes en este estudio han sido además contactados a los 3-4 años después de la inclusión en el mismo, con el objeto de recabar información sobre algunos cambios en hábitos y estilos de vida, de los que se sabe que están fuertemente relacionados con el riesgo de cáncer, como son: hábito de fumar, consumo de bebidas alcohólicas, actividad física, peso,

historia reproductiva, consumo hormonal y aparición de nuevas patologías.

El objetivo principal del seguimiento era la identificación de nuevos casos de cáncer entre los componentes de la cohorte. En 1996 se creó un grupo de trabajo que preparó un detallado protocolo para la recolección y estandarización de los datos clínicos y anatómo-patológicos, para cada localización tumoral. La identificación de lo nuevos casos de cáncer se basa principalmente en los registros de tumores en seis de los países participantes (Dinamarca, Italia, Holanda, España, Suecia y Reino Unido), donde el estudio se desarrolla en áreas cubiertas por registros de base poblacional. En los otros tres países (Francia, Alemania y Grecia) se basa en una combinación de métodos que incluye la revisión de datos de seguros médicos, registros de anatomía patológica, así como un seguimiento activo de los propios objetos del estudio o de sus parientes y conocidos. También se recoge la causa de la muerte, bien a partir del registro de tumores o de los registros nacionales de mortalidad. Basándose en los datos de incidencia publicados a partir de los registros, se prevé que aparezcan aproximadamente 22.000 casos de cáncer en la cohorte (EPIC) después de 10 años de seguimiento.

Los primeros resultados de los tumores más frecuentes se consiguieron entre 2001 y 2003. Y fueron, en los hombres, el cáncer de pulmón, colorrectal, próstata, vejiga urinaria, estómago, páncreas, laringe y riñón; en las mujeres fueron los cánceres de mama, colorrectal, útero, pulmón, ovario y páncreas.

Los estudios epidemiológicos sobre cáncer y nutrición han aportado sólidas pruebas de que algunos patrones dietéticos, características antropométricas y actividad física, juegan un importante papel en la etiología de algunos de los cánceres más frecuentes.

La dieta ha cambiado sustancialmente a través de los siglos y sigue cambiando a causa de factores económicos y culturales. Un mejor conocimiento de los alimentos que pueden reducir el riesgo de cáncer podría ayudar a orientar cambios futuros con el propósito de reducir esta enfermedad. Actualmente las recomendaciones de salud pública promueven el alto consumo de frutas y verduras y aconsejan moderación en el consumo de alcohol, carne, y de alimentos ricos en sal.

De acuerdo con el Comité sobre Dieta, Nutrición y Cáncer del Consejo Nacional de Investigaciones de EE.UU., existen pruebas epidemiológicas suficientes como para afirmar que el consumo de ciertos vegetales, en especial los ricos en carotenos, como la zanahoria, la col, el brócoli, la coliflor y la col de Bruselas, permite una reducción en la incidencia de cánceres en algunos lugares del planeta.

El hecho de que la dieta y los factores relacionados con la misma puedan estar implicados en la etiología y prevención de algunos cánceres, ha sido y sigue siendo tema de candente actualidad. Basándonos en los datos más recientes que indican como valor medio que alrededor de un 32 por 100 de las muertes por cáncer son debidas al tipo de dieta (Willet, 1995), en este sentido y apuntando una de las perspectivas pragmáticas del tema, Potter (1997) estima que si se produjera un incremento promedio de 2,5 veces en la ingesta de frutas y verduras en el mundo, podría llegar a prevenir hasta un 30 por 100 en total de cánceres de pulmón, de órganos gastrointestinales y de cuello de útero.

¿En qué momento puede intervenir un alimento y frenar la enfermedad?

El desarrollo de un tumor maligno comienza por alteración (mutación) en el ADN celular (iniciación), con el crecimiento incontrolado de la célula dañada (promoción) y su capacidad para invadir tejidos (progresión).

Paso 1. INICIACIÓN

El oxígeno que respiramos produce radicales libres de oxígeno, que pueden dañar la molécula de ADN. Los antioxidantes como los polifenoles que abundan en el té verde o el licopeno en los tomates, son sustancias que ayudan a neutralizar los radicales libres de oxígeno. Las vitaminas C, E y los betacarotenos son también poderosos antioxidantes.

Peligro exterior. Muchos agentes que causan cáncer ingresan en el organismo como sustancias potencialmente cancerígenas, que se

metabolizan en el hígado por los enzimas de la fase 1 y se convierten en cancerígenas con capacidad potencial de lesionar al ADN. El ajo, por ejemplo, contiene sulfuro de alilo, que ayuda a limitar la producción de las enzimas que se han mencionado en la fase 1.

Paso 2. PROMOCIÓN O AVANCE

Fallo defensivo. Si no funcionan las primeras defensas y una célula sufre los cambios y se convierte en cancerígena, el organismo procura que dichas células no se dividan. Los ácidos grasos, tipo Omega 6, potencian la división celular. Estos ácidos grasos están en el aceite de maíz o en el azafrán. Mientras que los ácidos grasos Omega 3 del pescado actúan impidiendo la división.

Los tejidos reproductores son particularmente sensibles al cáncer. Pueden dividirse rápidamente cuando sobre ellos actúan las hormonas sexuales. Los estrógenos, por ejemplo, provocan el rápido crecimiento de las células del pecho y del útero. Los productos derivados de la soja tienen isoflavonas (fitoestrógenos), que actúan de forma parecida a los estrógenos, pero sin su potente acción.

Paso 3. PROGRESIÓN

Invasión. Si todas las defensas faltan y una célula se transforma en tumoral, la cuestión clave es si invadirá los tejidos cercanos construyendo un sistema de irrigación sanguínea por alimentarse. Las células tumorales liberan unas sustancias que son factores de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, un proceso llamado angiogénesis.

Unas sustancias llamadas inhibidores CO X-2 como el resveratrol en las uvas rojas y la curcumina en la batata podrían suprimir la producción de los tumores al impedir la angiogénesis.

La dieta adecuada unida al ejercicio físico, los controles periódicos y los hábitos saludables de vida pueden tener una gran importancia preventiva, si bien en el caso del cáncer de pulmón, la prioridad es el abandono del tabaco.

Entre los medios para prevenir el cáncer de colon, 180.000 casos en Europa cada año, incluyen la ingesta de fibra y calcio.

Para el cáncer de próstata, 87.000, los estudios apuntan a que el licopeno presente en los tomates pueden reducir el riesgo de padecerlo. Para el cáncer de mama —180.000—, los especialistas recomiendan bajar los niveles de calorías, productos y grasas animales.

Antes de adentrarnos en las evidencias actuales sobre dieta y cáncer, hay que mencionar la limitación y la complejidad que supone el estudio de la dieta humana en sí misma. Los alimentos que consumimos cada día contienen cientos de sustancias químicas específicas, algunas todavía poco caracterizadas desde un punto de vista bioquímico, mientras que otras sólo están descritas de forma imprecisa.

Paralelamente, hay que tener en cuenta que la ingesta conlleva la interacción de sus componentes entre sí y con otros factores genéticos y ambientales. La complejidad de la interacción entre componentes dietéticos y el metabolismo de los mismos ha de tenerse en cuenta en el abordaje analítico de los resultados de los estudios sobre dieta y cáncer.

Desde un punto de vista pragmático, para reducir la incidencia de aquellos tumores relacionados con la dieta sería recomendable lo siguiente:

- Incrementar el consumo de frutas y verduras hasta al menos cinco porciones al día. Este factor aparece de una manera consistente como protector frente a la mayoría de los tumores, en particular, para el cáncer de colon y para el cáncer gástrico.
- Aumentar el consumo de cereales no procesados como fuente de polisacáridos no refinados.
- Disminuir el consumo de carne, especialmente las rojas y procesadas. El consumo de este tipo de alimentos está relacionado con cáncer intestinal, mama, próstata y páncreas. La World Cancer Research Fund recomienda, si se desea comer carne roja, que la ingesta de ésta no supere el 10 por 100 de las calorías ingeridas.

- Intentar evitar la obesidad. Sin llegar al extremo contrario hay que recordar que en la mujer la obesidad está relacionada con cáncer endometrial y de mama de mujeres post menopáusicas, y en el varón, con el cáncer intestinal. El peso corporal deberá mantenerse siempre en el rango de lo saludable.
- Tratar de evitar o reducir el consumo de alcohol, factor de riesgo para cánceres gastrointestinales, hepáticos y de mama. Las recomendaciones de consumo son no más de dos copas/día para las mujeres y tres para los varones.
- Reducir el consumo de alimentos salazonados y ahumados.
- Abstenerse de suplementos vitamínicos innecesarios.

Todas estas recomendaciones dietéticas deberán ir acompañadas de unos hábitos de vida saludables relacionados directamente con la aparición o no de diversos cánceres. El hábito del tabaco, la vida sedentaria, la exposición prolongada al sol sin control y padecer hepatitis B y C, son quizá los factores ambientales mejor conocidos, cuyo control, junto con una dieta saludable, podría hacer que la reducción del cáncer en generaciones futuras sea una realidad.

La sobrenutrición ha sido considerada como un factor de riesgo de cáncer desde hace más de 100 años. Destaca en particular un estudio epidemiológico reciente efectuado en 750.000 personas durante 13 años en EE.UU., que mostró cómo la sobrenutrición influye en el cáncer en varios sitios, menos en el pulmón. La obesidad juega un papel importante sobre todo en el cáncer de endometrio, de vesícula, etc. Existe también una relación entre el cáncer de endometrio y una exposición excesiva a estrógenos y resulta interesante saber que en las mujeres después de la menopausia, éstos se producen a partir de hormonas renales en el tejido adiposo, el cual se ve aumentado con la sobrenutrición.

De todos los elementos de la alimentación asociados epidemiológicamente con el cáncer, las grasas son las que más han sido estudiadas y de las que más pruebas se tienen de una asociación directa con esta enfermedad.

También existen pruebas de que el consumo excesivo de café tiene relación con el cáncer de vejiga y páncreas, pero mientras que

para el de vejiga no existen pruebas contundentes sobre una asociación entre la cantidad de café ingerido y el riesgo de padecer esos tumores, para el cáncer de páncreas sí se tienen.

Otra fuente adicional de riesgo asociada con la alimentación es la posible formación de nitrosaminas cancerígenas a partir de la interacción de los nitritos con las aminas que se hallan presentes en los alimentos. Los nitritos y nitratos están ampliamente distribuidos en los alimentos en concentraciones variables. Los vegetales y los embutidos con nitritos son los que más aportan esta sustancia. Se calcula que en EE.UU. un individuo consume alrededor de 75 mg de nitratos diariamente, que pueden ser convertidos en nitritos por bacterias presentes en la boca. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que junto con los nitritos y aminas pueden consumirse alimentos con sustancias que impiden la formación de nitrosaminas, como la vitamina C, o bien que la favorecen, como los fenoles.

En regiones del mundo donde se da con una elevada frecuencia el cáncer gastrointestinal se ha comprobado una elevada ingesta de nitritos y nitratos en el agua y alimentos. Se han publicado estudios epidemiológicos que sugieren una posible asociación entre el consumo de esas sustancias y una alta incidencia en cáncer gástrico y de esófago, en Colombia, Chile, Japón, Irán y EE.UU.

La contaminación de alimentos con hongos que producen toxinas (micotoxinas) capaces de inducir cáncer constituyen un riesgo en algunos países cálidos y húmedos de África, Asia y Centroamérica. Desde 1965 llama la atención la existencia de una elevada frecuencia de cáncer primario de hígado en países de África en los que se detectó el consumo de alimentos contaminados con el moho *Aspergillus flavus* (aflatoxinas).

De todo ello se deduce que la contaminación de alimentos con toxinas naturales capaces de inducir al cáncer puede evitarse con un almacenamiento adecuado y preservación de los mismos. A la vez debe reducirse al máximo el consumo de alimentos ricos en nitritos. Por el contrario, juegan un papel protector con relación al cáncer ciertos tipos de alimentos. Entre estos agentes se pueden citar algunas fibras vegetales, vitaminas y minerales. Las fibras contribuyen a dar volumen a los alimentos vegetales entre los que están las legum-

bres, las frutas y los cereales. En los países desarrollados se consumen menos alimentos fibrosos y más alimentos procesados.

Se ha observado que ciertos padecimientos intestinales comunes en países desarrollados son raros en las áreas rurales de África y la India, donde se consumen alimentos no procesados. Por ello se puede afirmar que el consumo de ciertos vegetales, en especial los ricos en carotenos como las zanahorias, la col, el brócoli, la coliflor y la col de Bruselas permiten una reducción en la incidencia de cánceres.

Toda la fibra dietética es de origen vegetal y está formada por un conjunto heterogéneo de componentes: celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y ligninas, que suelen ser resistentes a la digestión por parte de los enzimas humanos. También puede clasificarse en solubles e insolubles. Sus principales acciones son retrasar el vaciado gástrico, ralentizar la absorción de glucosa, reducir los niveles de colesterol y el tiempo de tránsito intestinal y aumentar el volumen de las heces. El aumento del contenido de fibra en la dieta parece tener un importante efecto protector fundamentalmente frente al cáncer de colon y de mama. Parece ser útil también frente a los cánceres de boca, faringe, esófago, estómago, endometrio y ovario.

Los mecanismos a través de los que puede actuar esta forma tan beneficiosa de la fibra dietética son varios:

- Reduciendo el tiempo de tránsito intestinal.
- Aumentando el volumen de las heces.
- Aumentando la frecuencia de evacuación.
- Disminuyendo el contenido del colon.
- Absorbiendo sustancias orgánicas e inorgánicas que de otra forma tendrían posibilidad de reaccionar con la mucosa del colon.

Es recomendable aumentar su consumo hasta 20 ó 30 gr. al día. Ello se logra aumentando el consumo de frutas, vegetales, pan, cereales y legumbres cada día.

Otros compuestos de los alimentos como los micronutrientes se han relacionado positivamente con relación a la prevención del cán-

cer. Son fundamentalmente el ácido fólico, el calcio y los conocidos como micronutrientes antioxidantes, entre ellos los más importantes son las vitaminas A —retinoides y beta carotenos—, las vitaminas C y E y el selenio.

Las fuentes más ricas de estos micronutrientes antioxidantes son también las frutas y los vegetales.

El licopeno es un pigmento natural que está presente en numerosas frutas y hortalizas. Es un carotenoide que proporciona el tomate y otros frutos. Un grupo de investigadores de la Universidad Norteamericana de Ohio ha publicado un estudio que avala los efectos beneficiosos de licopeno para la prevención del cáncer. Y añaden un dato nuevo, que estos beneficios sólo los poseen los alimentos naturales como el tomate, sandía, pomelo rojo, etc., pero no los suplementos como pastillas, etc. Son muchas las evidencias experimentales y epidemiológicas que han puesto de manifiesto en los últimos años que la ingesta alimentaria del licopeno está asociada con una disminución del riesgo de padecer enfermedades como cáncer, y dolencias cardiovasculares.

El equipo de Steve Clinton tomó como punto de partida el análisis de 194 ratones de laboratorio, se hicieron tres grupos, uno que fue alimentado con licopeno natural, otro con licopeno puro (en tableta) y otro con placebo.

Tras 14 meses de trabajo llegaron a la conclusión de que los animales que fueron alimentados con licopeno natural rebajaron un 26 por 100 sus posibilidades de morir de cáncer de próstata y comprobaron que no era lo mismo ingerir el licopeno por medio de los alimentos a través de la dieta, que tomar pastillas u otros suplementos que contengan la misma sustancia.

La investigación no indica si la reducción del riesgo de padecer cáncer de próstata se debe al licopeno en sí o si éste es sólo un biomarcador para la exposición a otros cancerígenos que se encuentren en el tomate.

En el 80 por 100 de los estudios realizados se ha encontrado una relación entre la ingesta de tomate y la disminución del riesgo de cáncer. Por otra parte, no se han hallado datos que indiquen efectos adversos relacionados por niveles elevados de licopeno.

Se comprobó que favorece la absorción del licopeno la combinación del tomate con el aceite, sobre todo si es de oliva. Esto sucede porque la presencia de lípidos en la dieta junto con productos ricos en ese pigmento natural facilita también su absorción.

Entre los compuestos vegetales que se consideran antioxidantes se encuentran los carotenos, los más conocidos son los betacarotenos y los licopenos.

Los carotenos, como el resto de los antioxidantes, son sustancias que frenan o paran la acción de los radicales libres en el organismo. Los radicales libres son muy agresivos y participan en todos los procesos degenerativos.

Los polifenoles son antioxidantes naturales de los vegetales que proliferan en las frutas, especialmente en las uvas. Las uvas tienen un gran poder antioxidante, debido a ellos y también tiene gran interés por ser un alimento rico en fibra. Sus efectos preventivos del estrés oxidativo de las células y por lo tanto de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer están avalados por multitud de estudios.

En varias investigaciones se ha observado que en los orujos del vino existía una cantidad extraordinaria de polifenoles asociados a la matriz de fibra dietética antioxidante. Su composición con más de 50 por 100 de fibra dietética y cerca del 30 por 100 de polifenoles combina en un solo producto las propiedades de las fibras de alta calidad y los antioxidantes naturales.

Los antioxidantes ejercen su acción principal durante la fase de iniciación de un tumor, evitando el daño celular derivado del estrés oxidativo —lesión del DNA— y favoreciendo la reparación del DNA dañado, la estabilidad de la membrana celular y la función inmunitaria. Además, estas sustancias poseen una gran variedad de aspectos biológicos que pueden incidir en cada una de las etapas de la carcinogénesis.

Voy a pasar a describir el mecanismo de acción.

Los mecanismos patogénicos que conducen al cáncer implican alteraciones en las vías de transducción de señales. Muchos oncogenes son versiones alteradas de los protooncogenes que codifican para proteínas que participan normalmente en la señalización celular.

La quimioprevención se define como el uso de sustancias de baja toxicidad, entre las que se incluyen muchos factores nutricionales, para interferir con el proceso de desarrollo del cáncer. Los compuestos quimiopreventivos presentes en lo que comemos o bebemos normalmente, están siendo objeto de numerosas investigaciones. Estas investigaciones tratan de identificar sobre qué vías celulares actúan los agentes dietéticos con potentes efectos anticáncer, para esclarecer el mecanismo que utilizan. Estudios recientes responsabilizan a las vías de señalización celular como el objetivo de los agentes quimiopreventivos. Las MAP quinasas (mitogen activated protein kinases) implicadas en la señalización celular, comprenden una familia de proteínas que median una sucesión de cascadas señalizadoras que se activan por una serie de estímulos extracelulares entre los que se incluyen los promotores tumorales. Las MAP quinasas participan en la regulación de muchas funciones tales como proliferación y crecimiento, movimiento celular, diferenciación, senescencia y muerte, comprenden varios subgrupos que actúan secuencialmente dando como resultado la activación de otras moléculas que pueden ser otras proteínas quinasas o factores de transcripción.

Alteraciones en la actividad de las MAP quinasas o las moléculas que modifican se han encontrado en numerosos cánceres humanos. Incrementos en la expresión genética o prolongada activación de esas MAP quinasas aparecen en cáncer de mama, pulmón, colon, próstata y riñón. De hecho, se han diseñado varios agentes farmacológicos para bloquear la cascada de las MAP quinasas en cáncer de colon y se han propuesto a las MAP quinasas como objetivos válidos para la prevención del cáncer. Se sabe que algunos compuestos integrantes de la dieta, como las flavinas y catequinas del té, el resveratrol, el 6-gingerol, el ester fenil etil del ácido cafeico, inhibidores de la proteinasa de la patata, etc., inhiben la activación de estas MAP quinasas.

El resveratrol pertenece a un grupo de compuestos denominados fitoalexinas, que se producen en plantas en casos de ambiente adverso. Ha sido identificado en más de 70 especies, siendo las uvas la fuente principal. La piel de las uvas contiene de 50 a 100 microgramos/gramo y el vino tinto contiene de 1,5 a 3 mg/litro. Se cree que es responsable de los efectos hipocolesterolemiantes del vino tinto y de aminorar el riesgo de enfermedad cardíaca.

Jang y colaboradores han demostrado que el resveratrol es efectivo en las tres fases del proceso tumoral: iniciación, promoción y progresión. El resveratrol posee actividad antioxidante y antimutagénica y eleva la actividad de la quinona reductasa, enzima capaz de detoxificar carcinógenos. Estos efectos indican que el resveratrol previene la iniciación, estado inicial e irreversible del proceso canceroso. El resveratrol muestra también efectos antiinflamatorios e inhibe la actividad de la ciclooxigenasa y de la hidroxilasa (ambas con actividad antipromotora). Además causa la diferenciación de las células de leucemia promielocítica humana, lo que indica que deprime también la progresión. Finalmente el resveratrol inhibe el desarrollo de lesiones preneoplásicas en glándula mamaria de ratón tratada con un carcinógeno en cultivo e inhibe la formación de tumores en estos animales. El resveratrol no presenta efectos tóxicos, pero ejerce su actividad antineoplásica estimulando la activación de la transcripción de la proteína p53 y su fosforilación dependiente de las MAP quinasas, conduciendo por ello las células transformadas hacia la apoptosis.

Los polifenoles y flavanoles o catequinas son componentes del té verde y del té negro. Estos compuestos interactúan con las vías de las MAP quinasas y parece que median la señalización manipulando su activación y fosforilación. Existen evidencias que demuestran que estos compuestos inhiben la transformación inducida por promotores tumorales o factores del crecimiento. También se ha demostrado actividad antioxidante de estos derivados del té, así como que inhiben la expresión de la metaloproteinasa de la matriz, enzima que juega un importante papel en la invasión y metástasis. En general, parece demostrado que las flavinas del té que inhiben la activación del factor de la transcripción AP-1, mediada por las vías de las MAP quinasas, lo cual es importante para reprimir la formación y crecimiento del cáncer. Esto demuestra, una vez más, que estas vías señalizadoras son buenos objetivos celulares quimiopreventivos para los componentes del té.

Vemos, por tanto, que son numerosos los componentes nutricionales que poseen actividad quimiopreventiva. Algunos de ellos, como las flavinas del té y el resveratrol se sabe que actúan específicamente sobre las vías señalizadoras dependientes de las MAP quinasas y de ahí su efecto anticáncer. Queda todavía por determinar si la consu-

mición de dietas ricas en estas flavinas o el resveratrol conlleva un verdadero efecto anticáncer en humanos. Uno de los mayores retos en la conquista del cáncer es conseguir eficientes mecanismos que permitan llevar a terreno clínico aquellos hallazgos demostrados a nivel experimental.

Así, el ácido ascórbico y el tocoferol inhiben la formación de nitrosaminas, por lo que son utilizados en los procesos de conservación de los alimentos procesados. El selenio es un cofactor esencial de la enzima glutatión peroxidasa, enzima que protege frente a la lesión oxidativa de los tejidos y administrado a dosis elevadas ha mostrado un efecto anticarcinogénico en modelos animales. Los flavonoides son compuestos fenólicos con propiedades anticarcinogénicas y con enorme potencia antioxidante que se encuentra en frutas, verduras y hojas de té. Los isoflavones, isómeros estructurales de los flavonoides poseen efectos antiestrogénicos, por lo que podrían prevenir el desarrollo de tumores hormono-dependientes. Estas sustancias se encuentran en los derivados de la soja, como el genistein se han visto involucradas en mecanismos inhibidores de la promoción del cáncer, tales como la apoptosis.

El retinol —vitamina A— y los retinoides en general, participan en el proceso normal del crecimiento y diferenciación celular. Como agentes quimiopreventivos actúan principalmente en las fases de promoción y progresión, en contraste con los antioxidantes que actúan en la fase de iniciación. En modelos animales, los retinoides han demostrado capacidad para suprimir o revertir la carcinogénesis, aunque pueden ser tóxicos a niveles terapéuticos.

El ácido fólico junto con la vitamina B12, la meteonina y la colina están implicados en la mutilación del DNA, proceso metabólico cuyo funcionamiento inadecuado se ha asociado con anomalías del DNA.

El beta caroteno ejerce su efecto protector frente a los cánceres de pulmón, esófago, estómago, colon, recto, próstata, mama, cuello uterino, ovario y piel. Su principal ventaja sobre los retinoides es que un aumento de su consumo o su suplemento en forma de cápsula no ocasiona problemas de hipervitaminosis.

RECOMENDACIONES INTERNACIONALES

Desde la OMS (Organización Mundial de la Salud) hasta asociaciones científicas de numerosos países, entre la que destaca la Sociedad Americana del Cáncer, existe un cierto consenso acerca de lo mejor que se puede comer en el sentido de que una alimentación más sana, más equilibrada y más variada es una eficaz medida de prevención no sólo del cáncer sino también de otras enfermedades.

Las principales recomendaciones de la OMS son:

- Ajustar la ingesta de calorías al gasto de energía para mantener un peso corporal aceptable y evitar el exceso de grasas, en especial de grasas saturadas y de colesterol.
- Aumentar la ingesta de hidratos de carbono complejos y de fibra dietética.
- Limitar la toma de azúcar y sal a niveles moderados.
- Limitar la ingesta de alcohol.

Por ello, tiene una importancia máxima dar a conocer estas recomendaciones a través de la educación nutricional.

Para reducir la ingesta de grasas es preciso disminuir el consumo de carnes rojas, mantequillas y grasas animales, y sustituirlas por carne magra, pollo sin piel, pescado y derivados lácteos desnatados. A la hora de cocinar son preferibles los alimentos hervidos, asados o cocidos al vapor. Debe utilizarse aceite de oliva para aliñar ensaladas y otros platos, y aumentar el consumo de fibra dietética en todas sus formas: verduras y hortalizas, pan y cereales, legumbres y frutas todos los días.

Como un tumor normalmente tarda un tiempo largo en desarrollarse, se pueden seguir una serie de recomendaciones y hábitos saludables a la hora de sentarse a la mesa.

La lucha contra el cáncer que mantiene la humanidad es un deseo perenne de alargar la vida humana y de mejorar la calidad de los últimos años de nuestra existencia.

La prevención de esta enfermedad, que afecta a más de 150.000 españoles cada año, pasaría entre otros aspectos como el ejercicio,

los controles periódicos o dejar de fumar por una reconversión de las costumbres alimenticias desde la infancia.

Ya en 1989 cuando se celebró el Año Europeo de Información contra el Cáncer, de la lista de medidas a tomar para prevenirlo, cinco se referían a la alimentación.

Los investigadores, las autoridades sanitarias y las organizaciones privadas continúan la carrera contra una dolencia que causará, en el año 2005, la muerte de ocho millones de personas en todo el mundo.

Cada día surge un nuevo descubrimiento que conecta aún más los tumores con la dieta.

Alimentos recomendables

Frutas y vegetales. Contienen agentes anticancerígenos como los carotenos, las vitaminas C y E, fibra y fitoesteroles.

Aceite de oliva, grasa monosaturada que se apunta como un agente preventivo del cáncer. Su consumo, además, está indicado en la prevención del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

El vino tinto, sin olvidar que su abuso es factor de riesgo de numerosas dolencias, entre ellas el cáncer, sin embargo tomar dos copas al día puede ser positivo, pues el RESVERATROL que contiene ejerce efectos antioxidantes y anticancerígenos a nivel celular.

La fibra. Los cereales, por ejemplo, se han demostrado altamente protectores en los casos de tumores de colon, mama, endometrio y próstata.

En realidad, no existe una dieta anticáncer, ni una dieta que lo cure una vez que ha hecho su aparición. Sin embargo, a partir de estudios y datos epidemiológicos se ha comprobado que cumplir una serie de recomendaciones alimentarias puede prevenir de manera significativa la aparición y desarrollo de las enfermedades oncológicas.

En nuestro país la dieta mediterránea es más sana, equilibrada y variada que la de otros países occidentales desarrollados. Debido a

ello, en los países mediterráneos la tasa de muerte relacionado con el cáncer es la mitad que la de los EE.UU.

Las recomendaciones de la Sociedad Americana del Cáncer son reducir la ingesta de grasa a menos del 30 por 100 de las calorías totales de la dieta, aumentar el contenido de fibra de la dieta a 20 ó 30 g al día, comer diariamente frutas y vegetales variados, evitar la obesidad, consumir alcohol en cantidades moderadas y consumir un mínimo de alimentos en salazón, en vinagre y ahumados.

CONCLUSIÓN

Existe una larga lista de importantes y frecuentes tipos de cáncer que parecen estrechamente relacionados con la alimentación de cada día, aunque no es el único factor causal a tener en cuenta sí es realmente importante.

Si de los factores ambientales externos el principal contribuyente a la aparición y desarrollo de distintos tipos de cánceres es el tabaco, a la luz de numerosos estudios internacionales llevados a cabo, se ha visto que la alimentación inadecuada puede ser el segundo. Si alrededor de un 30 por 100 de los cánceres se estiman relacionados con el tabaco, y otro 30 por 100 podrían estar relacionados con la alimentación, el objetivo de todas estas recomendaciones es llegar a prevenir el 30 por 100 de cánceres que se creen relacionados con la dieta.

BIBLIOGRAFÍA

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures, 1999.
- ARCHER, M. C. Cáncer y dieta. En E. Ziegler [L.j. Filer (eds.)]. Conocimientos actuales sobre nutrición: 515-518. Publicación científica n.º 565. Washington: OMS, 1999.
- BOTICARIO, C.; CALVO, C. (2000) Nutrición aplicada, Cdrom. UNED.
- BOTICARIO, C.; CALVO, C. (2001) Alimentación y Salud, Cdrom. UNED.
- BOTICARIO, C.; CALVO, C. (2003) Nutrición y dietética, aspectos clínicos. UNED.
- BOTICARIO, C.; CASCALES, M.; ESPAÑA, P. «Crecimiento Celular y Cáncer». Ministerio de Educación y Ciencia. UNED. Madrid, 2002.
- CUTHBERTSON, W. F. J. Are the effects of dietary fruits and vegetables on human health related to those of chronic dietary restriction on animal longevity and disease? *British Journal of Nutrition* 2002; 87:187-188.

- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
- NATIONAL CANCER INSTITUTO, Mayo 2002: «El uso del sistema inmune para tratar el cáncer».
- ROCK, C. H. L.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. (2001) Nutrition and breast cancer. In: Coulston, A. M., Rock, C. L., Monsen, E. R. (eds.). Nutrition in the prevention and treatment of disease. San Diego (CA): Academic Press, 337-355.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND/ American Institute for Cancer Research Expert Panel. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: WCRF/AICR, 1997.

Enrique Moles Ormella (1883-1953): Farmacéutico, químico y artista *

FRANCISCO GONZÁLEZ DE POSADA
*Académico Correspondiente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

*A la memoria de nuestro compañero, químico,
Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez*

Con la colaboración de **Francisco A. González Redondo**
(Universidad Complutense de Madrid) y **Dominga Trujillo**
Jacinto del Castillo (Universidad de La Laguna)

«Pertenece Moles a aquel tipo de hombre hechos para ser blanco de los más encontrados sentimientos; no por casualidad sino como lógica consecuencia de su actividad» (Cabrera, 1934).

«Siempre estuvo rodeado de amistades profundas e incondicionales y de malquerencias que sobrepasaban todos los límites posibles en una mente normal» (Berrojo, 1980).

1. A modo de justificación: algunas tareas para la recuperación de su memoria

¿A qué se debe que yo me atreva a aproximarles a ustedes esta relevante figura de la Farmacia y de la Química españolas? La res-

* El texto completo de esta conferencia, de las diapositivas presentadas en la sesión y el vídeo de la exposición oral y del debate posterior pueden verse en <http://www.ranf.com/images/moles/moles.htm>

puesta puede ser de este tenor: *osadía aparente*. Sustantivamente *osadía*, sin duda, ya que no soy ni historiador ni químico ni farmacéutico ni tampoco artista. Aunque adjetivamente *aparente*.

Después de muchos años «con-viviendo» con recuerdos de **Enrique Moles Ormella**, se me ha presentado la ocasión de ofrecer algunas nuevas consideraciones sobre él y dar cuenta de algunos existires documentales. Tenía, digámoslo así, cierta necesidad de hablar de Moles, y este foro es de excepcional relieve para el caso. Se trata de una especie de catálogo de pequeñas tareas realizadas con mis colaboradores que nunca pensé pudiera dar a la luz, porque nunca consideré de importancia lo hecho fuera de lo que pudiera significar de modesta colaboración en la recuperación de la memoria del químico español. A esto se une al gran cariño que he puesto en todos estos acontecimientos relativos a la historia de la ciencia en España.

Así, pues, no carece absolutamente de sentido esta especial y fugaz dedicación a la figura de Enrique Moles, aunque sea con el reconocimiento de mi condición de excéntrico (no propiamente historiador, ni químico, ni farmacéutico, tampoco artista) en el tema. Pero espero que se unan a mí en la modulación de la sustantiva *osadía* con el adjetivo *aparente*.

Yo creo que hoy Moles se siente feliz: regresa, después de más de 50 años (quizá 70) a esta casa en la que tantos años estuvo.

1.^a PARTE

BREVES NOTAS BIOGRÁFICAS DEL «QUÍMICO» MOLES

2. Moles, químico

Enrique Moles ha pasado a la historia de la ciencia española como químico, ocupando el lugar de excelencia que le concede el hecho de que el **Premio Nacional de Química** lleve su nombre. Sobre su condición de químico, la relevante, sin duda alguna, se ha escrito bastante, como puede verse en la bibliografía final; aquí es suficiente recordar lo más importante de su biografía y de su obra y hacerlo sintéticamente como marco en el que situar sus relaciones con la Farmacia.

El primer referente a destacar de su *curriculum* es la posesión de **cuatro doctorados** (dos españoles, dos europeos): Doctorado en Farmacia, Madrid, 1906; Doctorado en Ciencias Químicas, Leipzig, 1910 (con **Ostwald**, donde se especializa en Química Física); Doctorado en Ciencias Físicas, Ginebra, 1916 (con Guye, donde concreta su especialización en Pesos Atómicos); y Doctorado en Ciencias Químicas, Madrid, 1922.

El segundo referente capital puede ser su condición de **Jefe de la Sección de Química Física** en el **Laboratorio de Investigaciones Físicas** que dirigía Blas Cabrera Felipe, desde 1912, tarea que continuarían en los años treinta en el Instituto Nacional de Física y Química (edificio Rockefeller).

El tercer referente lo constituye el acceso en 1927 a **Catedrático de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias** de la Universidad Central.

Y el cuarto referente fundamental tuvo lugar en 1934 con su ingreso en la **Academia de Ciencias** Exactas, Físicas y Naturales (1).

Y ¿cuáles fueron sus haceres y haberes más importantes? (2). A modo de resumen, y en forma de catálogo, he aquí el conjunto de méritos que se le reconocen con generalidad.

1. Como investigador es verdad que no ofrece descubrimientos espectaculares, de los que suponen un impacto que impresiona socialmente. Su labor científica es continuada, crítica y perfectista, con constancia y tenacidad. Así lograría un reconocimiento internacional importante por sus contribuciones a la **determinación de pesos atómicos y moleculares por métodos físico-químicos** (métodos gasométricos —densidades límites de los gases— en oposición a los entonces usuales gravimétricos), trabajos que inició en Ginebra con **Guye** y que sería su principal campo de investigación. Se distinguió por el logro de una precisión extraordinaria en sus mediciones. Al regresar a España en 1917 formaría con un grupo de colaboradores el primer equipo de la «Escuela de Madrid» en el Laboratorio de Investigaciones Físicas. El grupo adquiriría autoridad y renombre internacional. En 1931 fue designado **Secretario de la Comisión Internacional de Pesos Atómicos de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada**. Ejerció una interesante labor de deter-

minación, revisión y control de los pesos y tomó parte activa en la confección de las Tablas Internacionales de Constantes y Patrones Físico-Químicos. De manera concreta sus aportaciones en este campo pueden sintetizarse en:

- a) Afinar métodos para conseguir valores progresivamente más exactos (así, un nuevo enunciado del método de las densidades límites).
- b) Aportar correcciones a los métodos de medidas de otros (espíritu crítico).
- c) Proporcionar revisiones (y más revisiones) de resultados propios y ajenos.
- d) Perfeccionar las medidas y cálculos.
- e) Contribuir a la mejora de las Tablas de Pesos Atómicos.

2. Como innovador docente debe destacarse su esfuerzo en pro de la introducción de la enseñanza y la investigación en Química Física en España.

3. A él se debe en gran medida la racionalización de la enseñanza de la Química Inorgánica. Luchador por la mejora del plan de estudios y la disposición de laboratorios dignos, procurando una buena enseñanza práctica. Creó las reválidas de licenciatura de carácter experimental. Y, en paralelo a todo ello, fomentó las relaciones con la industria.

4. Permanece en la memoria como un magnífico organizador de dotes excepcionales: revitalizó la Sociedad Española de Física y Química; fue promotor de la Federación Española de Sociedades de Química; tuvo una intensa relación con la Unión Internacional de Química; fue secretario general del IX Congreso Internacional de Química Pura y Aplicada (Madrid, 1934), primero celebrado en el mundo desde 1912. (Manifestaba especialmente su alegría por haber sido el primero en el mundo en reunir en un Congreso a científicos rusos y norteamericanos.)

«Nunca fue comparsa en ninguna institución a que perteneció y siempre se notó su presencia como protagonista destacado en ella» (3).

5. Finalmente, puede reseñarse que fue miembro destacado de los comités técnicos para la construcción de la Ciudad Universitaria y del Instituto «Rockefeller».

3. Enrique Moles, el hombre

Y junto al resumen de su historial químico parece conveniente pegeñar un retrato de su personalidad.

Las frases prologales de este trabajo, primera de Cabrera, su director, en 1934 —es decir, antes de la guerra civil—, y segunda de Berrojo, su biógrafo, en 1980, 27 años después de su muerte y ya en vías firmemente orientadas la recuperación de su memoria, caracterizan en primera aproximación al químico inorgánico y físico. No obstante, otro conjunto de notas o características personales pueden resultar de interés.

En primer lugar, por lo que respecta a la *inteligencia*, me atrevo a decir, con expresión fácilmente inteligible y algo de ironía, que fue «extraordinariamente *inteligente* pero nada *listo*», afirmación que explica claramente algunas de sus ingenuidades como, por ejemplo, su regreso temprano a España tras la guerra civil en 1942.

En segundo lugar, puede caracterizarse por una *voluntad* firme y una asombrosa capacidad de trabajo, incansable.

Fruto de esa inteligencia y de esa voluntad se manifestó siempre como un organizador de primera calidad. Cuidadoso y metódico. De carácter muy exigente con los demás y consigo mismo.

Y, en tercer lugar, por lo que respecta a la *sensibilidad*: apasionado, defensor de las causas que consideraba justas hasta notables extremos, de criterio —a veces— cerrado, con un sentido de la ironía que molestaba o incluso ofendía, aficionado al aire libre, entusiasta. Y artista, buen dibujante y pintor.

Al hablar de cualquier hombre español de su generación, que vivió la monarquía alfonsina, la dictadura primorriverista, la segunda república, la guerra (in)civil y la dictadura franquista, se hace estrictamente necesaria alguna referencia política. En el caso de Moles debe destacarse, en primer lugar, y sobre todo, que fue un *patriota* espa-

ñol de Barcelona que laboró siempre en pro de la ciencia y de su patria, de la ciencia española. Y en segundo lugar, debe afirmarse que fue esencialmente *apolítico*, como muestran todas sus relaciones internacionales antes y después de la guerra civil, independientemente de «todo lo que se le montó» al pecar de ingenuo en su regreso a España tras la contienda. Como expresiones de este apoliticismo básico pueden considerarse dos situaciones extremas: 1) En el conjunto del «grupo de Cabrera» fue, políticamente, el gran beneficiario de la Dictadura de Primo de Rivera (siempre contó con el decidido apoyo de Eduardo Callejo de la Cuesta, ministro del gobierno civil presidido por Primo de Rivera: la cátedra, la organización de la Sección de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central, en la calle de San Bernardo, su pertenencia a los comités de construcción de la Ciudad Universitaria y del Instituto Nacional de Física y Química); y 2) Durante la guerra civil fue, sin duda, el más comprometido con la República, llegando a ser, con Juan Negrín, Director General de Pólvoras y Explosivos (4).

2.^a PARTE

MOLES, FARMACÉUTICO QUÍMICO

4. La consideración actual de Moles en el contexto de los químicos españoles de la primera mitad del siglo XX

Sean suficientes unas notas más o menos generales para caracterizar la memoria de Moles en otra de las líneas que deseo considerar especialmente en este trabajo.

1. **Enrique Moles Ormella** ha pasado a la historia de la ciencia española como químico, y no sólo como químico, sino de hecho como «químico de Ciencias». Muchos de ustedes conocen la división que tenía enjundia antes de la guerra civil, y que en algún sentido la tendrá aún, con las expresiones tradicionales en España de «químicos de Farmacia» y «químicos de Ciencias», manifestación del tránsito del núcleo prioritario de la Química en las Facultades de Farmacia a su consolidación en Ciencias. El caso de Moles puede ser considerado como paradigmático.

2. Y no sólo ha pasado a la historia de la Química de Ciencias, como químico y sólo como químico, sino que ha tenido además la fortuna, que no tuvo en vida, de ser considerado el «padre de la química española» actual.

3. En su virtud, independientemente de la justicia histórica que el hecho suponga, el Premio Nacional de Química lleva su nombre, de modo análogo al Cervantes de las Letras, o al Torres Quevedo de la Ingeniería, o al Blas Cabrera de la Física.

4. En ninguna de las dos herencias capitales hay luz suficiente para catalogarlo definitivamente en su lugar en la historia. En las dos generaciones anteriores las figuras de la química española fueron **José Rodríguez Carracido** (5) y **José Casares Gil** (6). Coetáneos fueron **Ángel del Campo y Cerdán** (7), **José Giral Pereira** (8), **Obdulio Fernández y Rodríguez** (9) y **Antonio Madinaveitia Tabuyo** (10). En el conjunto constituido por éstos y Moles se resume lo considerado primordial, o figuras relevantes de la química española de la primera mitad del siglo XX. Con un poco más de precisión, la orientación histórica a la que quiero referirme aquí y ahora se centra en el papel más o menos importante en la consideración social de los profesionales de la química en España; que pasa de los «químicos farmacéuticos» Carracido y Casares a los «químicos de ciencias» Del Campo y Moles, estos últimos ciertamente «superiores» en condición científica a los «químicos farmacéuticos» de su generación Giral y Fernández (11).

5. Y por lo que se refiere a la gloria alcanzada como el más representativo de los químicos de la primera mitad del siglo XX, tampoco me atrevería a catalogarla de justa: sería más apropiado al menos que compartiera esa condición con su coetáneo y compañero **Ángel del Campo**, que le precedió en diferentes aspectos.

Y una consideración más relativa a su carácter. No podía pasar desapercibido: era lugar de encuentro de defensores acérrimos y de enemigos feroces, como se puso de manifiesto en dos circunstancias fundamentales de su vida: la oposición a la cátedra (1927) y el regreso del exilio (1941).

Sin embargo, aunque Moles ejerció de hecho como «químico de Ciencias» no debe olvidarse que fue antes que nada farmacéutico.

5. Objetivos de este trabajo

1.º Difundir su condición farmacéutica, recordando el espectro de relaciones con la Farmacia en sus expresiones continuas y discretas.

2.º Reivindicar su relevante figura de químico entre los notables químicos españoles «de Farmacia».

3.º Sugerir que esta Real Academia Nacional de Farmacia lo considere parte de su legado biográfico histórico.

4.º Complementariamente, dar a conocer su producción artística, la mayor parte correspondiente a su etapa juvenil considerada «bohemia» en Barcelona.

El objetivo central, pues, consiste en recuperar de alguna manera a Moles en su condición de farmacéutico, haciendo ver —recordando— que además fue un artista notable. Aparte de la extensa e intensa lectura de textos científicos e históricos tengo la vivencia de un largo contacto, durante muchos años, con los dos catedráticos que tenían a gala ser los últimos que obtuvieron cátedras de Química antes de la guerra civil (y que, por su juventud, aspiraron —y consiguieron— ser repuestos en «sus» (¿) cátedras durante la transición a la actual democracia): **Augusto Pérez Vitoria**, de Ciencias, discípulo de Moles, en Murcia; y **Francisco Giral González**, discípulo de **Antonio Madinaveitia**, en Santiago (repuesto en Salamanca, contra sus ilusiones de que hubiera sido en Madrid, por aquello del escalafón). Con ellos disfruté de fuertes lazos de amistad durante sus estancias en la patria tras sus exilios.

6. Moles, farmacéutico químico (12)

Conviene dejar constancia de que tanto sus inicios universitarios como investigadores fueron propiamente farmacéuticos, y, a modo de anticipo, destacar que su etapa final fue prioritariamente farmacéutica también. Entremedias, si quiere singularizarse así, fue primordialmente químico. De este modo sería suficiente recordar tres etapas: *a)* la inicial, propiamente farmacéutica, de estudios de Farmacia en Barcelona y Madrid y de profesor Auxiliar en Barcelona hasta su marcha a Alemania (1900-1910); *b)* la larga de Auxiliar en Farmacia

de Madrid (1911-1927), pero ya «hecho químico», continuada en la cátedra de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias hasta la guerra civil (1927-1936), en la que deben destacarse los detalles de su relación con la Farmacia; y *c*) la final (1941-1953), después de la guerra civil, más próximo a la Farmacia que a la Química.

En la línea indicada en los objetivos, deseo recordar algunos datos de su biografía que ponen de manifiesto que Enrique Moles no debe olvidarse en esta casa.

6.1. *Enrique Moles, licenciado y doctor en Farmacia*

Estudia la licenciatura en Farmacia, en la Universidad de Barcelona, con el expediente que se reproduce a continuación:

Licenciatura en Farmacia (Barcelona)

Curso 1900-01

Ampliación de Física	Notable
Química General	Sobresaliente
Mineralogía y Botánica	Aprobado
Zoología	Notable

Curso 1901-02

Técnica Física	Sobresaliente
Mineralogía y Zoología aplicada a la Farmacia	Sobresaliente

Curso 1902-03

Botánica Descriptiva y determinación de plantas Medicinales	Sobresaliente M.H.
Química Inorgánica aplicada a la Farmacia	Sobresaliente M.H.

Curso 1903-04

Materia farmacéutica vegetal	Sobresaliente M.H.
Química orgánica aplicada a la farmacia	Sobresaliente M.H.

Curso 1904-05

Análisis química, y en particular de los alimentos, medicamentos y venenos	Sobresaliente M.H.
Farmacia práctica y legislación sanitaria	Sobresaliente M.H.
Higiene pública	Sobresaliente M.H.

Se presenta a los exámenes de Grado de Licenciatura en Farmacia, en Barcelona, en 1905, y obtiene Sobresaliente. Posteriormente se presenta a los ejercicios de oposición para el Premio extraordinario que consigue.

Se traslada a Madrid para realizar la tesis doctoral. Conviene dejar constancia también de que precisamente en el año 1905 **José Casares Gil** obtiene la cátedra de Madrid (13). Su expediente del Doctorado en Farmacia es el siguiente:

Curso 1905-06

Química biológica con su análisis	Sobresaliente
Microbiología	Sobresaliente
Historia crítica de la Farmacia y Bibliografía farmacéutica	Sobresaliente



FIGURA 1. *Licenciado en Farmacia, Barcelona, 1905.*



FIGURA 2. *Doctor en Farmacia, Madrid, 1906.*

La tesis de 1906 se tituló: «Procedimientos de análisis de silicatos seguidos en el análisis cuantitativo de algunas micas españolas» y fue calificada con Sobresaliente. En ella muestra su gratitud a José Casares Gil y Marcelo Rivas Mateos que han puesto a su disposición sus respectivos laboratorios. El doctorado en Farmacia sería el primero de los cuatro doctorados que alcanzaría. (Más adelante, como hemos visto, obtendría los de Química en Leipzig, Física en Ginebra y Química en Madrid.)

6.2. Enrique Moles, profesor en Farmacia

En 1907 es profesor *auxiliar supernumerario gratuito* en la **Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona**. Y en 1908 *auxiliar interino gratuito*.

En esta época traduce libros, manuales, propiamente farmacéuticos: *Guía práctica de análisis de orina* (de Karl Konia), *Manual de Técnica bacteriológica, conteniendo las más importantes indicaciones técnicas para los trabajos de laboratorio de bacteriología* (de Rudolf Abel) y *Manual de técnica bacteriológica* (de Rudolf Abel); y como labor propia, en colaboración con Antonio Novellas, escribe *Formulario-guía de Farmacología, Terapéutica y Análisis químico-farmacéuticos*, en 1908, librito de 15 × 10 cm², de unas 500 páginas.

En 1908 se desplaza a Alemania, a Munich y Leipzig, donde trabaja principalmente con Ostwald, y obtiene el doctorado en Químicas en 1910.

Sus discípulos químicos afirman que el tránsito por Munich y Leipzig marcó el cambio de orientación de la Farmacia a la Química. Mi intelección, a los efectos de la consideración histórica, es otra: los «mejores» farmacéuticos universitarios eran entonces prioritariamente químicos (recuérdense, por ejemplo, los casos reiteradamente citados de Carracido y Casares) y la mejor química circulaba en España por las Facultades de Farmacia. No debe olvidarse que en esta época no existían Facultades de Química, sino de Ciencias, y en éstas sólo una especialidad de Físico-químicas. El contexto de espacio y tiempo es necesario tenerlo muy presente: en la España intersecular XIX-XX las Facultades de Farmacia eran mucho más

«químicas» y estaban mucho mejor dotadas (en químicas inorgánica, orgánica, análisis y biológica) que las de Ciencias.

A título de anécdota puede recordarse el siguiente párrafo escrito por su hijo (farmacéutico), en 1975:

«en su época juvenil, antes de dedicarse de un modo preferente a la investigación pura, había creado una serie de productos medicamentosos, buena parte de los cuales se encuentran todavía en el mercado español [¡en 1975!], registrados y explotados por diversos laboratorios farmacéuticos nacionales» (14).

A la vuelta de Alemania aún «trabajaba en colaboración con algunos laboratorios productores de medicamentos».

En 1911, a la vuelta de Alemania y siendo Decano José Rodríguez Carracido, accede a la condición de profesor *auxiliar numerario* de la cátedra de Química inorgánica en la **Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid**, donde se establece como discípulo de José Casares Gil, ya dedicado éste también a su condición de diputado. En consecuencia, si universitariamente pretende progresar, acceder a una cátedra, ha de emigrar de Farmacia. Así, sería profesor auxiliar numerario de la Facultad de Farmacia de Madrid hasta la obtención de la cátedra de Química Inorgánica en la Facultad de Ciencias de Madrid en 1927.

Su conocimiento de idiomas, sus relaciones y sus trabajos en Alemania y Suiza, le confieren en y desde España una respetable altura internacional.

Y a partir de 1912 es **Jefe de Sección, de Química Física, en el Laboratorio de Investigaciones Físicas** (de la Junta de Ampliación de Estudios) que dirige Cabrera, donde haría sus contribuciones más importantes.

Su condición de (sólo) Auxiliar en Farmacia resulta incoherente con el hecho de ser propuesto como experto, formando parte de tribunales de cátedra de Universidad, ¡desde el año 1913!, debido a su alto prestigio alcanzado a título personal y por el creciente del Laboratorio de Investigaciones Físicas.

Lo que podríamos llamar sus «instintos farmacéuticos», o «espíritu de cuerpo», se manifiesta, al menos formalmente, en la cátedra

de Análisis Químico de la Facultad de Ciencias de Madrid, 1913, en la que formó parte del tribunal, siendo tan joven y ya considerado por el Consejo de Instrucción Pública como «competente». A pesar de ser compañero de Ángel del Campo en el Laboratorio de Investigaciones Físicas, votó por José Giral, dejándola vacante.

Veamos algunos ejemplos significativos de la consideración científica en que se le tenía, para justificar sus presencias en tribunales correspondientes al año 1925.

En el Tribunal de la Cátedra de «Química General» de la Universidad de La Laguna:

«Don Enrique Moles, Profesor Auxiliar de la Facultad de Farmacia de la Central, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor del Laboratorio de Investigaciones Físicas, ex pensionado en Alemania y Suiza, autor de varias Memorias publicadas en revistas españolas y extranjeras sobre revisión de pesos atómicos por métodos físico-químicos y clásicos, densidad de aire y otras» (R.O. 25 de mayo de 1925)».

En el Tribunal de la Cátedra de «Química Inorgánica aplicada a la Farmacia y práctica de laboratorio» de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada:

«Don Enrique Moles, Profesor Auxiliar de la Central, Doctor en Farmacia y Ciencias Químicas, ex pensionado en el extranjero, autor de 64 trabajos de investigación sobre temas de Química inorgánica pura y aplicada, así como sobre Química farmacéutica, premiado por la Real Academia de Ciencias de Madrid» (R.O. 10 de agosto de 1925)».

También deben recordarse aquí algunos trabajos químicos próximos a la Farmacia de este período, sobre todo porque algunos de ellos están escritos en colaboración con miembros iniciales de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Acerca de los aristoles y de la determinación cuantitativa del timol (con M. Marquina).

Contribución al estudio de los nitratos de bismuto, con numerosas derivaciones hacia la Farmacia (con Eugenio Sellés Martí, académico).

Acerca de algunos complejos orgánicos del bismuto (con Ramón Portillo, académico).

6.3. *Su vinculación con el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid*

Moles estuvo bastante vinculado al **Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid**, ostentando su representación en diversas ocasiones y participando con frecuencia en sus actividades, especialmente dictando numerosos cursos y conferencias.

Así, por ejemplo, el 5 de mayo de 1922 habla sobre «Los métodos físico-químicos en sus aplicaciones a la Farmacia» (15), de modo que tras su celebración, *El Restaurador Farmacéutico* publicó una amplia reseña (16).

El 12 de enero de 1924 diserta sobre «La Química-Física y la Farmacia» (17).

El Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid, en 1930, con motivo del Primer Centenario de la inauguración del edificio de la Facultad de Farmacia (al que se concede carácter oficial por R. O. de 9 de septiembre) (18), es decir, de este edificio que hoy nos acoge, organizó un Gran Certamen científico hispanoamericano, y en la relación de premios establecidos puede encontrarse, con el número 19:

«Premio «Profesor Enrique Moles»
200 pesetas en metálico.
Diploma especial
al mejor trabajo de Físico-Química» (19).

El Jurado estaría integrado por José Ranedo Sánchez-Bravo, Ramón Portillo Moya-Angeler y Eugenio Sellés Martí, a quienes todos ustedes identifican con la primera relación de académicos de esta (entonces no Real) Academia Nacional de Farmacia que nacería formalmente en 1932 (20).

En esos actos centenarios, Moles pronunciaría también otra conferencia, aunque no se menciona el título de la misma (21).

En este punto parece de interés reproducir los párrafos que María del Carmen Francés, actual Académica-Secretaria de esta Real Aca-

demia Nacional de Farmacia, dedica a aquellos momentos germinales de la Academia (22):

«Y con esta denominación, el Real Colegio siguió su creciente labor de fomento de la Ciencia mediante concurso de premios, conferencias, sesiones científicas y publicaciones hasta que las autoridades gubernativas plantearon el problema de que no podían existir legalmente dos entidades con igual nombre: “Colegio de Farmacéuticos”, el viejo y glorioso Real Colegio (del que estamos hablando), y el obligatorio de la provincia de Madrid. Previas consultas a quienes podían informar con la altura e imparcialidad necesaria, se optó por dejar el nombre de Colegio, que significa gobierno y defensa de la profesión y adoptar el de Academia, que define a las Sociedades que fomentan una Ciencia o Arte; pero siendo ésta una Corporación oficial, correspondía al Estado disponer y aprobar los oportunos cambios. Coincidió este incidente con la inolvidable conmemoración del primer centenario de la inauguración del edificio de la Facultad de Farmacia en 1930 y con la celebración del segundo Congreso Nacional de Farmacia, puesto que el 29 de noviembre se cumplían los cien años de la nueva casa de la calle de la Farmacia.

Respaldada por el brillantísimo éxito del Congreso, quedaba la máxima aspiración de la antigua Corporación y de la Clase: transformarse en Academia. La propuesta fue elevada al Gobierno, en los tres últimos meses del régimen monárquico, con el apoyo resuelto de Su Majestad y la favorable decisión del Ministro señor Tormo, pero, por la inestabilidad política, este asunto quedó sin resolver. Un año después, tras difíciles gestiones, se consiguió que el Gobierno republicano aceptase el cambio de nombre de Real Colegio de Farmacéuticos por el de Academia Nacional de Farmacia, con fecha de enero de 1932».

(Entre paréntesis y dado el lugar que nos acoge, debo confesar que para mí constituye un misterio la no presencia de Moles entre los académicos iniciales de la Nacional de Farmacia en 1932. La ausencia de Obdulio Fernández puedo entenderla, tanto antes de la guerra civil como después de ésta, por sus difíciles relaciones con Casares, pero no fue éste el caso de Moles) (23).

6.4. *La presencia de Moles en las revistas especializadas de Farmacia*

Aunque sea solo someramente conviene destacar algunas notas (24) relativas a la presencia de Moles en las revistas farmacéuticas porque así se comprueba, desde otra perspectiva, su vinculación con la Farmacia. He aquí una sucinta relación.

En 1924, *El Restaurador Farmacéutico*, en su primera página, dedica una amplia crónica de la entrega a Moles en Barcelona del prestigioso Premio Pelfort (25).

En 1926, *El Restaurador Farmacéutico*, en la sección «Noticias», da cuenta del nombramiento como representantes de España en la VII Conferencia Internacional de Química de «los catedráticos de Farmacia, nuestros queridos amigos Dr. Obdulio Fernández y Dr. Enrique Moles» (26). Como puede apreciarse, éste es incorrectamente elevado a la categoría de «catedrático» en esta referencia de 1926, momento en el que es (sólo) Auxiliar Numerario en Farmacia (al año siguiente obtendría la cátedra en la Facultad de Ciencias).

En 1927, *El Monitor de la Farmacia y de la Terapéutica* publica un breve trabajo suyo titulado «Los fenómenos de superficie. Su importancia químico-farmacéutica» (27). Más adelante, en la sección «Poliantea», da la noticia de que ha ganado la cátedra de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de Madrid «nuestro compañero y colaborador el Catedrático auxiliar de la Facultad de Farmacia don Enrique Moles» (28) (donde se reitera erróneamente su condición de catedrático de Farmacia).

En 1928, *El Monitor de la Farmacia y de la Terapéutica*, en dos ocasiones, bajo el título de «Ateneo farmacéutico», anuncia ciclos de conferencias, organizados por la Asociación de Estudiantes Católicos de Farmacia, en los que interviene Moles con los títulos «Importancia del sistema periódico en Química inorgánica» y «Teoría de la valencia y constitución de los compuestos» (29).

En 1930, *La Farmacia Española* da cuenta de las conferencias que pronuncia en Granada de títulos «Concepto de compuesto químico» y «Los complejos y su importancia». En la misma revista se recoge la constitución de la sección local de la Sociedad Española de Física y Química, de la que Moles es presidente nacional.

En 1936, *El Restaurador Farmacéutico* dedica una gran extensión al Homenaje a Casares Gil con motivo de su jubilación el día 8 de julio. En él interviene Moles recordando sus años de estudiante al lado de Casares y el apoyo decidido de éste para la introducción en España de los estudios de química-física.

6.5. *El viaje a Argentina y Uruguay*

En el verano de 1930, en la plenitud de su gloria como químico, período 1927-36, visita Buenos Aires, La Plata, Rosario de Santa Fe y Montevideo. Los temas que desarrolla son prioritariamente químicos, pero las instituciones que lo reciben y le conceden honores son mixtas o farmacéuticas.

El 21 de agosto dicta una Conferencia en la **Escuela de Farmacia** sobre «**La adsorción y su interés específicamente farmacéutico**», en la que expone múltiples ejemplos farmacéuticos.

El 23 de agosto se organiza una recepción en su honor en la **Sociedad Nacional de Farmacia** para recibir el mensaje del **Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid** de presentación del

«(...) doctor Enrique Moles, **catedrático de la Universidad de Madrid y farmacéutico** (...)

De todo ello es embajador el doctor Moles, quien a **su gran cultura, que lo coloca en los primeros puestos de la Farmacia, un acendrado patriotismo y no menor amor al título que posee**, circunstancias que avaloran su carácter excepcional, su personalidad eminente, en la que deseo vean ustedes representados a todos los farmacéuticos españoles y muy especialmente al último de todos, pero el primero en admirarlos y profesarles fervorosa simpatía y afecto: doctor **Zúñiga Cerrudo, Presidente**» (30).

Este texto confirma la vinculación de Moles con el Real Colegio y constituye una prueba positiva más de su participación activa en la vida del mismo. Sirva para reiterar, ya sin paréntesis, la extrañeza que me produce el que no fuera integrado como académico de Farmacia.

En dicha sesión dicta la conferencia «**Importancia de la Química-física en Farmacia**» cuyo contenido versa sobre la aplicación de

métodos físico-químicos a las actividades farmacéuticas y en la que cita a Raurich y Topper.

Como resumen de sus actividades, presencias y reconocimientos en Argentina se reproduce el título que le concede la Asociación Farmacéutica y Bioquímica Argentina al año de su visita.

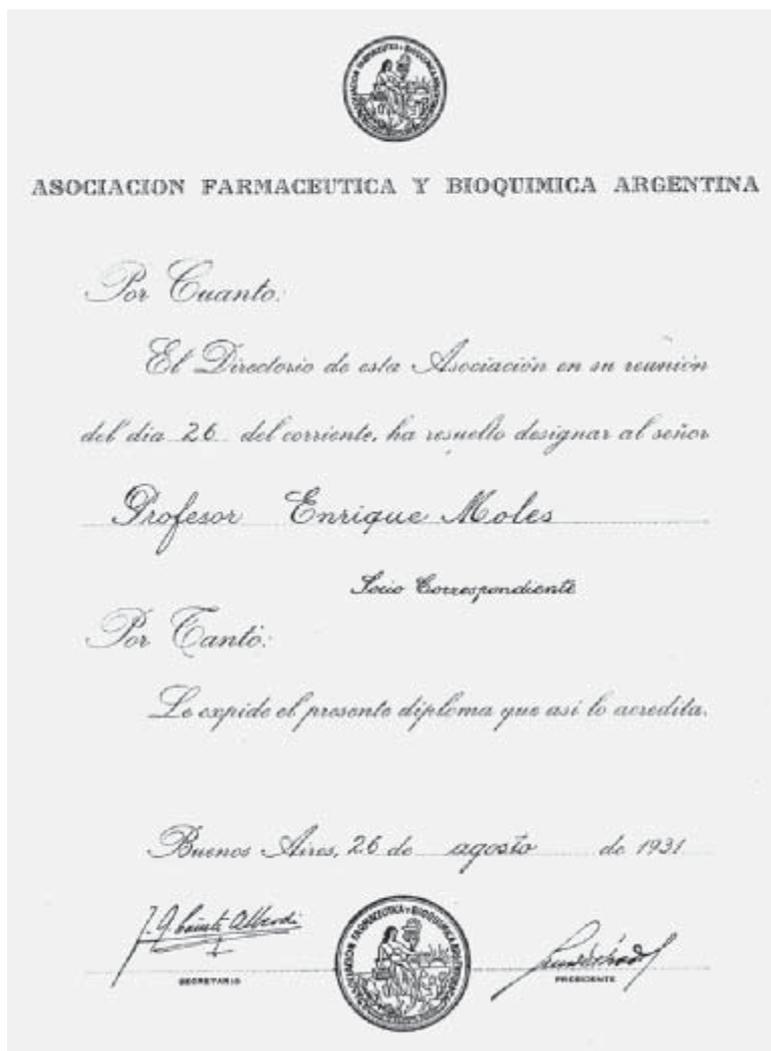


FIGURA 3. Título de Socio Correspondiente de la Asociación Farmacéutica y Bioquímica Argentina

Concluida la visita a Argentina se desplaza a Uruguay y en la **Facultad de Química y Farmacia de Montevideo**, en septiembre de dicho año 1930, dicta un Curso de doce conferencias. En los *Anales* de la **Asociación de Farmacia y Química del Uruguay** se edita un número especial dedicado al doctor Moles del que se reproduce la página inicial.

<u>Tomo XXXIII. — N.ºs 7 y 8</u>	<u>Julio y Agosto de 1930</u>
ANALES DE LA ASOCIACIÓN DE FARMACIA Y QUÍMICA DEL URUGUAY	
SUMARIO	
	<u>Págs.</u>
<i>Lanza J. :</i> El profesor Enrique Moles.....	95
Curso de conferencias del profesor Moles.....	99
<i>Giribaldo D.:</i> Fundamento teórico de la determinación precisa de los pesos moleculares y atómicos a partir de las densidades gaseosas.....	103
<i>Moles E.:</i> Densidad normal del nitrógeno químico..	151
<i>Moles E.:</i> Estudio crítico de las medidas modernas acerca de la densidad del oxígeno.....	161
Publicaciones científicas del profesor E. Moles... ..	195

FIGURA 4. *Ejemplar de los Anales de la Asociación de Farmacia y Química del Uruguay dedicado a Moles.*

Por otra parte, fue nombrado Profesor *ad honorem* de la Universidad de Montevideo, por la **Facultad de Química y Farmacia** en dicho mes de septiembre de 1930.

6.6. *El IX Congreso Internacional de Química*

Un acontecimiento de especial relevancia para la ciencia española en general, y especialmente para la Química de nuestro país, fue la celebración en Madrid del **IX Congreso Internacional de Química, 1934**, del que pueden hacerse algunas consideraciones desde el punto de vista de la Farmacia:

- a) Supuso para la Química española aún más que la venida de Einstein, 1923, para la Física española.
- b) Estuvo organizado por Obdulio Fernández (farmacéutico), Ángel del Campo (químico), Enrique Moles (farmacéutico y químico) y José Giral (farmacéutico).
- c) Con este motivo se concedieron tres doctorados *honoris causa* en Farmacia (cinco en Ciencias) a relevantes figuras extranjeras.
- d) Por lo que respecta a su difusión en la prensa pueden recordarse las referencias de *El Debate*, con firma de Luis Palacios Pelletier (Académico de la Nacional de Farmacia, recién creada en 1932), y *La Voz de la Farmacia*, que comenta ampliamente los aspectos farmacéuticos del Congreso.

Moles fue considerado como el artífice del éxito del Congreso y, junto a las felicitaciones que recibieron los organizadores citados, él recibió diversos honores europeos, entre los que interesa destacar aquí la Medalla del Centenario de Auguste Behal, París, 1935, Professeur de Chimie Organique a la Faculté de Pharmacie.

6.7. *Unos detalles de antes y de después de la guerra civil*

Un acontecimiento científico social importante en el mundo farmacéutico, y de cierto relieve en el ámbito de lo que puede llamarse

la «farmacia química», lo constituyó la jubilación de, y homenaje a, José Casares Gil, el 8 de julio de 1936. Un documento gráfico muestra claramente la sintonía de Moles y Casares en estos momentos.

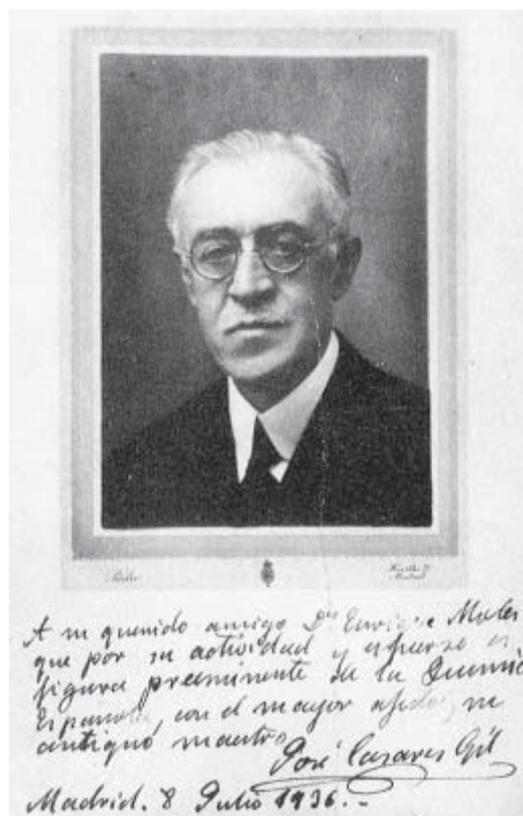


FIGURA 5. Dedicatoria de José Casares Gil, maestro, en el homenaje por su jubilación, a Moles, discípulo.

Durante la guerra civil continúa Moles sus relaciones científicas internacionales e incrementando la extensa relación de honores.

Recién exiliado Moles en París tras la guerra civil recibió como primera ayuda económica la del Profesor Justo Cerdeiras, catedrático de la Universidad de Montevideo y Presidente de la Comisión Científica de la Asociación de Farmacia y Química del Uruguay.

Su hijo continuó en París los estudios de Farmacia y defensa contra gases en la Escuela de Farmacia y en el Instituto Católico de París.

6.8. *Su hijo y biógrafo, farmacéutico*

Su hijo, Enrique Moles Conde, empezó la licenciatura en Farmacia en la Facultad de Madrid y «avanzaba con cierta fortuna en la carrera» cuando estalló la guerra civil y se encontraba en Asturias. A su regreso a España, para acabar sus estudios, por dificultades académicas surgidas en Madrid, tuvo que examinarse también en Santiago. Y concluida la licenciatura fue, en el sentido popular, «farmacéutico».

El padre, nuestro Enrique Moles Ormella, le compró la oficina de farmacia que estableció en el Paseo de Onésimo Redondo, número 12, y en ella se hizo él mismo, al mismo tiempo, «farmacéutico», colaborando con el hijo. La casa de Moles padre ocupaba la parte posterior de la oficina propiedad de Moles hijo. Eran tiempos, los años cuarenta y primeros cincuenta, en los que había muchos medicamentos —fórmulas— que preparar. ¡Con qué ilusión los haría!

6.9. *En el Laboratorio Ibys*

Durante los diez últimos años de su vida, desde que salió de la cárcel, 1943, con libertad condicional, hasta su muerte, investigó en un Instituto farmacéutico donde ingresó, retirado de sus puestos de la Universidad y del Instituto Nacional de Física y Química, como investigador, el «Instituto de Biología y Sueroterapia (IBYS)» de Madrid, en el que continuaría trabajando, como colaborador y consejero técnico, hasta su fallecimiento.

Publicó en la revista del Instituto dos trabajos: «El peroxhidróxido de magnesio» y «Contribución al estudio de los peroxhidroxidos», compuestos de indudable proyección farmacéutica. Escribió su hijo:

«Sus nuevos trabajos científicos se encaminan principalmente al estudio y utilización de los peroxidróxidos o perhidroles —particularmente los de magnesio y calcio—, el tribromofenato

de bismuto y algunos otros productos de interés químico y farmacológico. Dando, en cierto modo, un salto atrás, idea y prepara nuevas fórmulas de interés farmacéutico» (31).

Pérez Vitoria (1953), en su necrológica de Moles, añade otros trabajos de éste no publicados: «Preparación extemporánea y purificación de diversos fármacos», «La cámara de desinsectación. Su funcionamiento», y «Los cloritos y el peróxido de cloro. Su importancia actual».

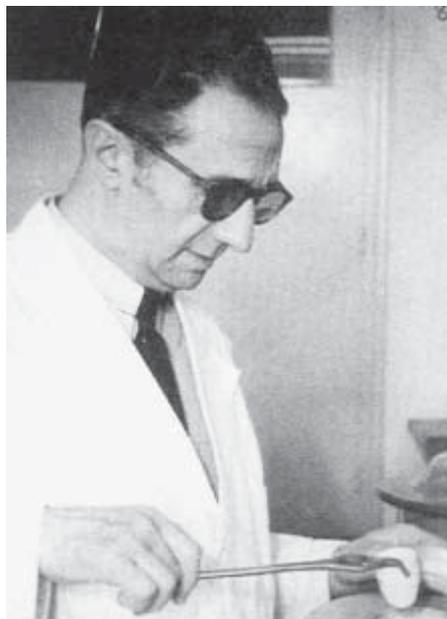


FIGURA 6. *En el laboratorio farmacéutico Instituto de Biología y Sueroterapia (IBYS). Madrid, 1949.*

A pesar de su extraña situación y sin que fuera repuesto en ninguno de los lugares que le correspondían (Cátedra de la Universidad, Consejo Superior de Investigaciones Científicas como ente continuador del Instituto Nacional de Física y Química, Academia de Ciencias), dado su prestigio internacional logra, no sin dificultades extremas y después de diez años, que se le conceda pasaporte. Así dictó diferentes conferencias en las Sociedades Químicas Nacionales de Bélgica, Dinamarca, Francia y Suiza.

6.10. *En la Facultad de Farmacia de La Habana y la Academia de Farmacia de Cuba*

En el verano de 1951, invitado por la **Facultad de Farmacia de La Habana** y la **Academia de Farmacia de Cuba** para dar una serie de conferencias, emprende el que iba a ser su último viaje al extranjero.

Se reproducen unos elementos para dejar constancia documental de estas actividades académicas específicamente farmacéuticas.

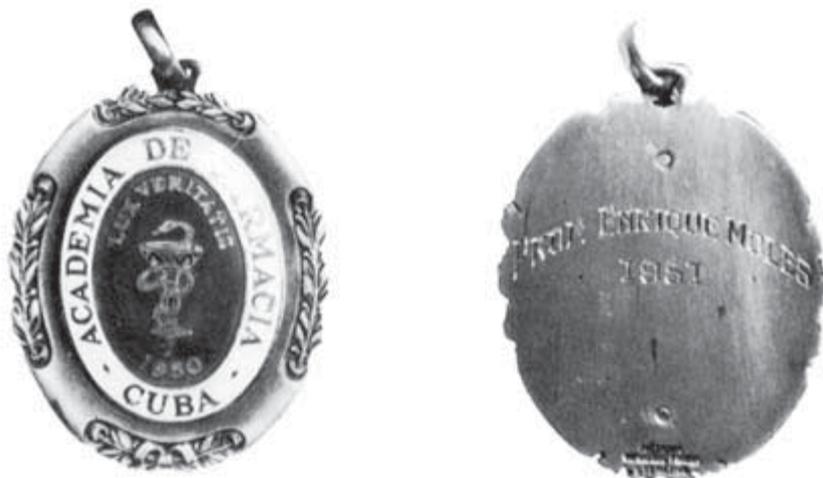


FIGURA 7. *Medalla de Miembro correspondiente de la Academia de Farmacia de Cuba.*

6.11. *Tesis doctoral sobre Moles*

Finalmente, en estas consideraciones farmacéuticas, aunque sea sólo a modo de anécdota, conviene dejar constancia de que en 1980 Raúl Berrojo Jario presenta su tesis doctoral, «Enrique Moles y su obra», en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Destaco la naturaleza del símbolo: el químico español natural de Barcelona, licenciado en Farmacia en la Facultad de Barcelona, que hubo de salir de la ciudad condal para hacerse doctor en Madrid, Leipzig y Ginebra, regresa a su Barcelona natal, estudiantil y bohemía (¡75 años más tarde!) transformado en tema de tesis doctoral en Farmacia.

3.^a PARTE

MOLES, ARTISTA

7. Moles artista

Otro de los aspectos a reivindicar, quizá en este caso mejor informar o bien recordar, es que Enrique Moles desarrolló una obra artística de cierta calidad en sus años de juventud en Barcelona, y, presupuestamente también, después en Madrid e incluso en Ginebra.

En una exposición artística el objeto principal se centra en la contemplación de las obras de arte, en penetrar en la expresión del artista. Usualmente no necesitamos ni de presentadores ni de críticos. Quizá después, si quedamos gratamente *impresionados*, nos guste un cierto recreo intelectual con tareas de lectura complementarias de textos escritos por artistas profesionales, historiadores o críticos.

Por ello quiero ofrecer a ustedes un catálogo (32) no editado de obras artísticas de nuestro farmacéutico químico que posee Amigos de la Cultura Científica, y tiene en la actualidad en depósito en el Centro Científico-Cultural Blas Cabrera, y algunas otras que en la actualidad posee su nieta Beatriz Moles Calandre, también farmacéutica, en Zaragoza. Debo manifestar que se ha perdido la pista de algunos otros.

En consecuencia, pocos comentarios y suficiente reproducción de sus plumillas, apuntes y dibujos al carbón, acuarelas, óleos y temple. Se consideran prácticamente todas ellas obras juveniles.

Parece que era en los veranos que pasaba en Balaguer (Lérida), tierra natal de la madre y donde la familia poseía propiedades, con otro ambiente y otros paisajes, cuando desarrolló esta faceta artística, más libre y original que la científica, de la pintura, empleando diversas técnicas (carbón, pastel, acuarela y óleo) y fijando su atención en los paisajes y sobre todo en los tipos y costumbres del país.

He podido leer en la biografía de su hijo que dejó de pintar después de su primera visita al Museo del Prado, como consecuencia

de su venida a Madrid para hacer el doctorado, al contemplar por primera vez cuadros de Velázquez y de Goya; éste le entusiasmaba especialmente. Yo más bien me inclino a pensar que debió tener un encuentro con el joven Pablo Ruiz (después Picasso) en Barcelona y supo intuir lo por venir en las artes plásticas.

En resumen, su obra consiste en:

«(...) notables apuntes al carbón, acuarelas —originales o copias—, dibujos al pastel y óleos, principalmente copias, algunas muy notables, de originales debidos a los pintores del Romanticismo español» (33).

Complementariamente, en 1921, se publican dos ediciones, Madrid y Barcelona, del *Epistolario de Carlota*, de Federico Schiller, traducción del alemán y prólogo de E. Moles y R. Marquina (34), dedicado en este caso a una imprevisible actividad literaria aunque fuera transitoria.

Como apuntes finales reproduciré unos párrafos entrañables del libro de su hijo (35):

«(...) no se borrará nunca de mi memoria la imagen, muchas veces repetida, de mi padre (1951) con Beatriz (su nieta de cuatro años) sentada en sus rodillas, manteniendo con ella animadas conversaciones y dibujándole, con su particular gracia y estilo, toda clase de cosas, por iniciativa propia o a petición de la pequeña (...)

Amaba el arte, especialmente la pintura, que dominaba y había practicado con fortuna, aunque luego la abandonara casi por completo por circunstancias diversas, y la música clásica (en este aspecto, puede señalarse como dato curioso el hecho de que, en los primeros tiempos de su matrimonio y siendo su esposa una buena violinista, intentó él mismo aprender a tocar el violín (...). Estas aficiones hicieron que, siempre que se le presentaba ocasión, visitara museos y asistiera a conciertos —fue admirador y amigo de Pablo Casals, y sintió asimismo una gran admiración por el maestro Fernández Arbós y por otros grandes artistas de múltiples nacionalidades, que tuvo ocasión de conocer y admirar y, a veces, de tratar personalmente (en su época alemana, asistía siempre que ello le resultaba posible, a los festivales wagnerianos)—. Y en otro aspecto y en su época de juventud conoció y trató a diversos pintores de fama, especialmente Santiago Rusiñol y Ramón Casas».

EPÍLOGO

8. Consideración final a título de sugerencia

Fervientes discípulos de Moles, desde el inicio de la transición política española, se entregaron a la tarea de la recuperación de la memoria del maestro sacándolo del olvido. Los «químicos rockefellerianos», los que estaban en el interior y los que regresaron del exilio, realizaron intensos esfuerzos. Se celebraron numerosos eventos: un primer homenaje en 1978, la celebración del Cincuentenario del Rockefeller en 1982 en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la conmemoración del Centenario del nacimiento en 1983, etc., etc., actos en los que me concedieron reiteradas veces el honor de asistir y de participar. Otros fueron directamente organizados bien por el Aula de Cultura Científica bien por Amigos de la Cultura Científica. Así, Enrique Moles, farmacéutico, aunque farmacéutico químico o «químico de Farmacia», como entonces se denominaban, tras estos múltiples actos, y durante la etapa de gobierno socialista, ocuparía el ara de la Química española: el **Premio Nacional de Química** lleva su nombre. Los químicos tienen olvidado al que fuera, quizá, no sólo el primero sino tan importante como él entre los químicos españoles de la denominada «edad de plata» de la cultura española, Ángel del Campo, y con un olvido absoluto lo han sustituido en exclusiva por Enrique Moles.

Pero aquí el tema es otro. En nuestra Real Academia Nacional de Farmacia tenemos en elevados sitios a otros grandes farmacéuticos químicos: **José Rodríguez Carracido** y **José Casares Gil**. Pues bien, una vez que **Enrique Moles Ormella** ha logrado ocupar el ara histórica de la Química española, parece conveniente que en la Academia se le conozca más y mejor y que se le integre en el legado biográfico farmacéutico español. Tenemos algunas figuras relevantes, pero no estamos sobrados de ellas, y no podemos despreciar ninguna.

Por ello me atrevo, finalmente, como una nueva manifestación de osadía, a sugerir que la Real Academia Nacional de Farmacia convierta la actual *dualidad de farmacéuticos historiables* (36) *referida a la primera mitad del siglo XX en trinidad*. Tenemos entronizado a José Rodríguez Carracido por la Medalla, y análogamente a José

Casares Gil por la Fundación de Amigos de la Academia. Parece conveniente que al *químico español oficialmente máximo* lo reconocamos también por lo que fue: farmacéutico. Pensemos en algo para perpetuar a don Enrique Moles Ormella entre nosotros.

9. Bibliografía específica sobre Moles

- BERROJO JARIO, R. (1980): *Enrique Moles y su obra*. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- CABRERA, B. (1934): *Discurso de contestación* al de Moles en la Academia de Ciencias. Madrid.
- GONZÁLEZ DE POSADA, F. *et al.* (1988): «Enrique Moles, Químico». Catálogo de la exposición de este título en el conjunto denominado «Homenaje a la Cultura Científica Española». Vélez-Málaga: Universidad Internacional de la Axarquía (Costa del Sol Oriental).
- GONZÁLEZ DE POSADA, F. *et al.* (1997): «Enrique Moles, químico español, primer colaborador de Blas Cabrera». Catálogo de la exposición de este título. Arrecife: Centro Científico-Cultural Blas Cabrera.
- GONZÁLEZ DE POSADA, F. y TRUJILLO JACINTO DEL CASTILLO, D. (1995): *Ensayo introductorio* a Cabrera, B. y Moles, E. (1995): *La teoría de los magnetones y la magnetoquímica de los compuestos férricos (1912-1913)*. Vol. II-1 de la obra «En torno a Blas Cabrera Felipe», dirigida por F. González de Posada (editados los 14 volúmenes de la serie II: «Obras completas comentadas: sus libros»).
- INSTITUTO IBYS (1953): «Enrique Moles Ormella (1883-1953)», en *IBYS*, Año X, núm. 2, marzo-abril, 1953, pp. 75-77.
- MOLES CONDE, E. (1975): *Enrique Moles. Un gran químico en España*. Madrid: Artes Gráficas L. Pérez.
- NOGAREDA DOMÉNECH, C. (1983): *En el Centenario del Profesor Moles*. Salamanca: Ediciones de la Universidad de Salamanca.
- PÉREZ VITORIA, A. (1953): «Enrique Moles (El hombre, el investigador, el profesor; su influencia en la Química española)», *Ciencia*, tomo XIII, pp. 12-23. México, junio de 1953.
- PÉREZ VITORIA, A. (1983): «Enrique Moles y el Sistema Periódico de los Elementos». *Aula de Cultura Científica*, núm. 17. Santander: Amigos de la Cultura Científica.
- PÉREZ-VITORIA, A. (Coord.) (1985): *Enrique Moles. La vida y la obra de un químico español*. Madrid: CSIC.
- PÉREZ VITORIA, A. (1986): «La era Moles en la química española». *Aula de Cultura Científica*, núm. 29. Santander: Amigos de la Cultura Científica.
- PÉREZ VITORIA, A. (1990): «Un químico y una exposición». *Aula de Cultura Científica*, núm. 38. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- REDONDO ALVARADO, M. D. (1997): *Ensayo introductorio* a Cabrera, B. (1997): *Magneto-Chimie/Magnetoquímica (1918)*. Vol. II-5 de la obra «En torno a Blas Cabrera Felipe», dirigida por F. González de Posada (editados los 14 volúmenes

de la serie II: «Obras completas comentadas: sus libros»). Madrid: Amigos de la Cultura Científica.

RIBAS MARQUES, I (1954): «Españoles en la Historia de la Ciencia. Don Enrique Moles Ormella (23 de agosto de 1883-30 de marzo de 1953)», *Zeltia (Revista de información médico-sanitaria)*, Año II, núm. 1, marzo de 1954, pp. 27-30.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Las Academias «perdieron» la condición de «Real» con el advenimiento de la II República.
- (2) Aquí deben considerarse como fuentes documentales principales la tesis doctoral de BERROJO (1980) y los trabajos de Augusto Pérez-Vitoria que se citan en la Bibliografía.
- (3) BERROJO (1980), p. 4.
- (4) Los demás físicos y químicos de mayor relevancia científica, de hecho, no estuvieron alineados: CABRERA y DUPERIER marcharon al exilio; PALACIOS y DEL CAMPO permanecen en el Madrid sitiado; CATALÁN en la España nacional vigilado.
- (5) JOSÉ RODRÍGUEZ CARRACIDO (Santiago de Compostela, 1856; Madrid, 1928). Catedrático de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de Madrid en 1881 y de Química Biológica en 1898. Académico de Ciencias (1887-1928), de Medicina (1906-1928) y de la Lengua (1908-1928).
- (6) JOSÉ CASARES GIL (Santiago de Compostela, 1866; Santiago de Compostela, 1961). Catedrático de Técnica Física y Análisis Químico en Farmacia de Barcelona, y en Madrid desde 1905. Académico de Ciencias (1913-1961), Académico de Medicina (1918-1961) y Académico de Farmacia (1932-1961).
- (7) ÁNGEL DEL CAMPO Y CERDÁN (Cuenca, 1883; Madrid, 1944). Catedrático de Química Analítica en la Facultad de Ciencias de Madrid en 1915. Académico de Ciencias (1928-1944). (Único propiamente de Ciencias —licenciado en Físico-químicas y doctor en Químicas—, es decir, no farmacéutico, del elenco de «químicos» considerado.)
- (8) JOSÉ GIRAL PEREIRA (Santiago de Cuba, 1879; México, 1962). Catedrático de Química Orgánica en Farmacia de Salamanca en 1905 y de Química Biológica en Madrid en 1927. Académico de Medicina (1935-¿1962?).
- (9) OBDULIO FERNÁNDEZ Y RODRÍGUEZ (Frías, Burgos, 1883; Madrid, 1982). Catedrático de Química Orgánica y Biológica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid, y decano. Académico de Ciencias (1918-1982), de la que fue secretario y vicepresidente. Académico de Medicina (1934-1982). No lo fue de Farmacia. Se consideró «perseguido» por CASARES, según sus memorias.
- (10) ANTONIO MADINAVEITIA TABUYO (Madrid 1890; México, 1974). Catedrático de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia en Granada, 1916, y de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia y Prácticas de Laboratorio en la Facultad de Farmacia de Madrid, 1925, donde fue Decano.
- (11) Puede verse GONZÁLEZ REDONDO, F. A., FERNÁNDEZ TERÁN, R. E. y GONZÁLEZ REDONDO, A. (2004): «Santiago Ramón y Cajal y la nueva senda de la Química Orgánica en España. En torno a Antonio Madinaveitia Tabuyo». En GONZÁLEZ

- DE POSADA, F. *et al.* (ed.): *Actas del III Simposio «Ciencia y Técnica en España de 1898 a 1945: Cabrera, Cajal, Torres Quevedo»*, pp. 127-149. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- (12) En este punto soy deudor importante de la tesis doctoral de RAÚL BERROJO (1980).
 - (13) Tampoco está de más dejar constancia de que CASARES se dedicaría pronto a la política, como RODRÍGUEZ CARRACIDO y la mayoría de los más significativos científicos españoles de esas generaciones, salvo los más grandes: SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL y LEONARDO TORRES QUEVEDO.
 - (14) MOLES CONDE, E. (1975), p. 109.
 - (15) *El Restaurador Farmacéutico* (1922), p. 205.
 - (16) *Ibid.*, p. 301.
 - (17) *Ibid.* (1924), p. 20.
 - (18) *Bol. Of. Min. Inst. Pub.* 20.9.29, n.º 76, p. 393.
 - (19) *Ibid.* (1929), p. 516.
 - (20) *Ibid.* (1930), p. 457.
 - (21) *Ibid.* (1930), p. 645ss.
 - (22) Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia (2004), *Anuario 2004*, pp. 14-15.
 - (23) Tampoco formaron parte de ella los farmacéuticos JOSÉ GIRAL y ANTONIO MADINAVEITIA.
 - (24) Para más detalles puede consultarse BERROJO (1980).
 - (25) *El Restaurador Farmacéutico* (1924), p. 277ss.
 - (26) *El Restaurador Farmacéutico* (1926), p. 462.
 - (27) *El Monitor de la Farmacia y de la Terapéutica* (1927), **33**, 3.
 - (28) *Ibid.*, p. 170.
 - (29) *El Monitor de la Farmacia y de la Terapéutica* (1928), p. 79; y p. 481, respectivamente.
 - (30) *Anales de la Institución Cultural Española*. Tomo III (1926-1930). Segunda Parte. Buenos Aires, 1953, p. 510. Citado por Berrojo (1980). TORIBIO ZÚÑIGA SÁNCHEZ-CERRUDO fue el primer presidente de esta Real Academia Nacional de Farmacia (formalmente se le considera Presidente desde 1919 hasta 1934), como puede apreciarse, por ejemplo, en nuestro *Anuario 2003*, p. 39. El uso de negritas es mío.
 - (31) MOLES CONDE, E. (1975), p. 109.
 - (32) Durante la exposición oral de este trabajo en el Salón de la Academia se proyectaron reproducciones de las obras artísticas de MOLES conservadas.
 - (33) MOLES CONDE, E. (1975), p. 15.
 - (34) RAFAEL MARQUINA, escritor y periodista, estaba casado con Concepción Moles, hermana de Enrique, que se establecerían en Cuba en torno al año 1930.
 - (35) MOLES CONDE, E. (1975), p. 113.
 - (36) Según el concepto de Américo Castro que he utilizado en diversas ocasiones y con más extensión en el tratamiento de AUGUSTO GONZÁLEZ DE LINARES. Puede verse la monografía: GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1989): «Augusto González de Linares: su historiabilidad». *Aula de Cultura Científica*, n.º 34. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.

————— *Artículo original* —————

Phenobarbital pretreatment increases thioacetamide induced necrosis and post-necrotic regeneration in rats

DAVID ANDRÉS, DOLORES SARRIÓN, ASUNCIÓN ZARAGOZA,
MIRANDELI BAUTISTA & MARÍA CASCALES

Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM), Facultad de Farmacia

ABSTRACT

One of the most important events related to drug interactions is the ability of some drugs to induce hepatic microsomal monooxygenases and to increase the toxicity of other drugs. A single intraperitoneal dose of thioacetamide was administered to rats (500 mg/Kg) to induce liver necrosis and regeneration; and on this experimental model the influence of intraperitoneal phenobarbital administration (80 mg/Kg/day) for five days before thioacetamide was studied. The results show that phenobarbital pre-treatment increased liver damage induced by thioacetamide, as detected by increases in serum enzymatic activities, levels of total bilirubin, and by the extent of the necrotic area in the perivenous acinar region. The higher liver injury was parallel to the higher rate of tissue regenerative response as demonstrated by the rate of DNA synthesis in hepatocytes and the level of α -fetoprotein in serum. We can conclude that phenobarbital pre-treatment enhanced hepatotoxicity and hepatocellular regeneration, but did not change either acinar location or timing of liver injury and regeneration induced by thioacetamide. Moreover, the proliferative response as well as the changes in diploid and polyploid populations, were more pronounced in phenobarbital pretreated hepatocytes.

Key Words: Phenobarbital.—Thioacetamide.—Liver injury.—Liver regeneration.

RESUMEN

El pretratamiento con fenobarbital incrementa la necrosis y la regeneración postnecrótica inducida por tioacetamida

Uno de los aspectos más importantes de las interacciones de fármacos es la habilidad de algunos de ellos de inducir las monooxigenasas microsomales hepáticas e incrementar la toxicidad de otras drogas. Se administró a las ratas una dosis única de tioacetamida por vía intraperitoneal (500 mg/Kg de peso) para provocar una necrosis y regeneración hepática; sobre este modelo experimental se estudió la influencia de la administración intraperitoneal de fenobarbital (80 mg/Kg/día) durante los cinco días previos a la administración de la tioacetamida. Los resultados muestran que el pretratamiento con fenobarbital incrementó el daño hepático provocado por la tioacetamida, como se demuestra por los incrementos de las actividades enzimáticas en suero, niveles totales de bilirrubina y por la extensión del área necrótica en la región acinar perivenosa. Este mayor daño hepático fue paralelo al incremento de la respuesta regenerativa del tejido como queda demostrado por el aumento de la síntesis de DNA y por el nivel de α -fetoproteína en suero. Podemos concluir que el pretratamiento con fenobarbital aumenta la hepatotoxicidad y la regeneración hepatocelular, sin embargo, no modifica ni la localización acinar ni el patrón temporal del daño hepático y regeneración inducida por la tioacetamida. Además, tanto la respuesta proliferativa como los cambios en las poblaciones diploides y poliploides, fueron más pronunciados en los hepatocitos pretratados con fenobarbital.

Palabras clave: Fenobarbital.—Tioacetamida.—Daño hepático.—Regeneración hepática.

INTRODUCTION

It is well known that phenobarbital (PB) induces P450-dependent metabolic processes in liver tissue (1, 2). This inductive response has a major impact on drug interactions (3, 4). Thus, PB potentiates the hepatotoxicity of cocaine by increasing the severity of liver damage and shifting the intraacinar injury from the perivenous to the periportal area of the liver acini (3). PB also potentiates the hepatotoxicity of thioacetamide and enhances the activity of flavin-containing monooxygenase (4). Infliction of toxicant-induced injury is accompanied by a parallel tissue repair stimulation response, which allows the organism to overcome the injury up to a threshold dose. Beyond this threshold, a diminished or delayed tissue repair response allows an unrestrained progression of injury. The

stimulation of liver repair through hepatocyte proliferation has been shown to permit the recovery from massive and normally lethal liver injury. The concept of toxicodynamic interaction between inflicted injury and stimulated tissue repair offers opportunity to fine-tune many pharmacological aspects.

Thioacetamide (TA) is a potent hepatotoxic agent which, when administered at doses of 500 mg/Kg to rats, originates a severe hepatocellular perivenous necrosis (5, 6). The initiation of the chain of cellular events leading to TA-induced liver necrosis is due to the generation of reactive metabolites: S-oxide and sulfone, obligatory intermediates in the process of microsomal oxidation of TA (7-9). The selective destruction of perivenous hepatocytes and the immediate proliferative state of the remaining liver cells, have been used as an experimental model by which to study the hepatic response against the aggressive attack of a hepatotoxic drug. Thus, this response presents a double aspect: the hepatocellular necrosis and the post-necrotic regeneration linked to the restoration of liver function (10, 11).

Phenobarbital (PB) induces efficiently the transcription of several isoforms of cytochrome P450 (12), and, consequently, has the ability to enhance the activity of hepatic drug metabolizing enzymes, which can result in the increased metabolism and toxicity of drugs (2, 13).

The aim of the present study was to clarify experimentally whether PB, potentiating the hepatotoxicity and the amplification of the hepatic injury induced by TA, also affects the proliferative regenerating state immediately triggered following the necrosis, as well as to visualize the location and extent of the necrotic area on liver slices. Accordingly, rats were treated or not with PB for five days previous to administration of TA. To follow the time course of events, samples of blood, liver and hepatocytes were obtained at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h of TA intoxication. Morphological study, parameters of liver injury, and those related to TA metabolism were obtained. The proliferative post-necrotic response was assayed by evaluating the mitotic index on glass slide mounted sections of liver, as well as by determining the serum levels of α -fetoprotein and the ploidy and DNA distribution in the cell cycle phases in isolated hepatocytes by flow cytometry.

MATERIAL AND METHODS

Chemical reagents

Enzymes and collagenase were obtained from Boehringer Mannheim. Substrates, coenzymes and propidium iodide were from Sigma Chemical. Standard Analytical grade Laboratory Reagents were obtained from Merck.

Animals and sampling

Male Wistar Rats aged 2 months (200-225 g) were supplied with food and water *ad libitum*, and exposed to a 12 h light-dark cycle. The following groups were established: (A) rats were pretreated intraperitoneally with 0.9% NaCl daily for five days before a single sublethal dose of TA (500 mg/Kg body weight) freshly dissolved in 0.9% NaCl. (B) rats were pretreated intraperitoneally with PB freshly dissolved in 0.9% NaCl (80 mg/g body weight) daily for five days before TA administration. (C), rats were pretreated with PB daily for five days, and instead of TA, this group received NaCl 0.9%. The control of each group refers to samples obtained at 0 h (before TA administration in group A and B, and before NaCl administration in group C). Each experiment was performed in duplicate from four animals, and followed the international criteria outlined in the «Guide for the care and use of laboratory animals» published by the National Institutes of Health (NIH publication n.º 80-83, revised 1985).

Processing of the samples

In order to clarify the sequential changes during the different stages of liver injury and regeneration, samples were obtained from control (0h) and at 12, 24, 48, 72, and 96 h following TA intoxication in groups A and B, and following NaCl in group C. Rats were sacrificed by cervical dislocation and samples of liver were obtained and processed as previously described (14). Blood was collected from hearts and kept at 4°C for 24 h, centrifuged at 3000 rpm for 15 min,

and serum was obtained as the supernatant. Liver samples were obtained for morphological and mitotic index analysis. Another group of rats was used for hepatocyte isolation.

Histological study

Rat liver pieces untreated and pretreated with PB following thioacetamide intoxication were fixed in 10% formaldehyde embedded in paraffin, sectioned (5 μm) and stained with hematoxylin and eosin. The mitotic index was calculated on glass slide mounted liver sections as the ratio of number of mitosis per cell density in the perivenous and midzonal acinar regions according to the method of Simpson *et al.* (15).

Enzyme and metabolite assays

Enzyme determinations were carried out in serum and in the microsomal fraction of the liver homogenates in the optimal conditions of pH and temperature, and with substrates and cofactors at saturation. Several determinations were carried out in serum of rats: Isocitrate dehydrogenase (nm/min/ml serum) was determined spectrophotometrically at 340 nm in the presence of isocitrate and NADPH (16); total bilirubin ($\mu\text{g/ml}$ serum) was determined spectrophotometrically at 578 nm with sulfanilic acid diazoreagent in the presence of caffeine (17). α -fetoprotein (ng/ml serum) was detected by enzymatic immunoassay of particles (MEIA) as described by Wespie (18) modified by Barnes *et al.* (19). Proteins were evaluated by the method of Bradford (20).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were expressed as mmol/g of fresh liver. Liver pieces were homogenized in trichloroacetic acid and the supernatant was treated with thiobarbituric acid. Samples were heated at 90°C for 15 min, centrifuged and the absorbance was measured at 535 nm as described by Niehaus and Samuelsson (21).

In the microsomal fraction of liver, obtained as previously described (4), the activities of flavine-containing monooxygenase (FMO) and the *O*-dealkylation of pentoxiresorufin, as enzyme marker

of cytochrome P-450 2B, were determined. FMO activity, expressed as nmol/min/mg protein, was assayed spectrophotometrically at 420 nm by measuring the N, N-dimethylaniline oxidation (22). Pentoxiresorufin O-dealkylase activity, expressed as pmol of resorufin/min/mg protein, was determined as previously described by Honkakoski and Lang (23), by measuring the formation of resorufin using a Perkin-Elmer spectrofluorimeter at the excitation and emission wavelengths of 522 and 586 nm, respectively.

Isolation of hepatocytes and flow cytometry analysis

From rats anaesthetized with 50 mg/Kg sodium pentobarbital dissolved in 0.9% NaCl, hepatocytes were isolated by perfusion *in situ* according to the classic collagenase method (24). Cell viability, determined by tripan blue exclusion, was greater than 90%. For the analysis of DNA content and ploidy, 1×10^6 viable cells were stained with propidium iodide following the multistep procedure of Vindelov *et al.* (25). The emitted fluorescence (FL2A) of the DNA-propidium iodide complex was assayed in a FACS-scan flow cytometer (Becton-Dickinson). A double discriminator module was used to distinguish between signals coming from a single nucleus and those produced by nuclear aggregation. Data were analyzed by evaluating single nucleus inputs (10^4 nuclei/assay).

Statistical analysis

The results were calculated as the means \pm SD of four experimental observations obtained from four animals. Differences between groups were obtained by analysis of variance followed by Snedecor F ($\alpha = 0.05$). Student t test was performed for statistical evaluations as follows: all values against their control as (a), the PB-pretreated group against untreated as (b). Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

PB increases cell proliferation in the liver (26); and, as a result, the ratio liver weight/body weight increases significantly. In our experimental conditions the increase of this ratio was 150% (4).

Histological study

The experimental liver toxicity was confirmed by means of histopathology and serum assays. The histopathological study was carried out to detect the acinar location of necrosis, and to establish the relationship between the histopathological events and the biochemical parameters of liver injury. Figures 1-4 show the liver morphology observed by light microscopy in sections of 5 μ m obtained from non PB pretreated (Figure 1 & 3) or pretreated rats (Figures 2 & 4). Figures 1 & 2 (magnification 125), corresponding to rat liver at 24 h following TA, show the necrotic areas surrounding the central vein, and the much more pronounced extent of these areas in liver of PB pre-treated rats (Figure 2). The extent of the necrotic areas was parallel to other parameters of liver injury, such as serum alanine and aspartate aminotransferases, isocitrate dehydrogenase or total bilirubin. PB pretreatment did not affect the intraacinar location of necrosis.

Figures 3 & 4 show the morphology (magnification 625) of rat liver following 48 h of TA administration. Figure 3 corresponds to non PB pretreated liver and Figure 4 corresponds to PB-pretreated liver. In both microphotographs, cells in mitosis are clearly visible.

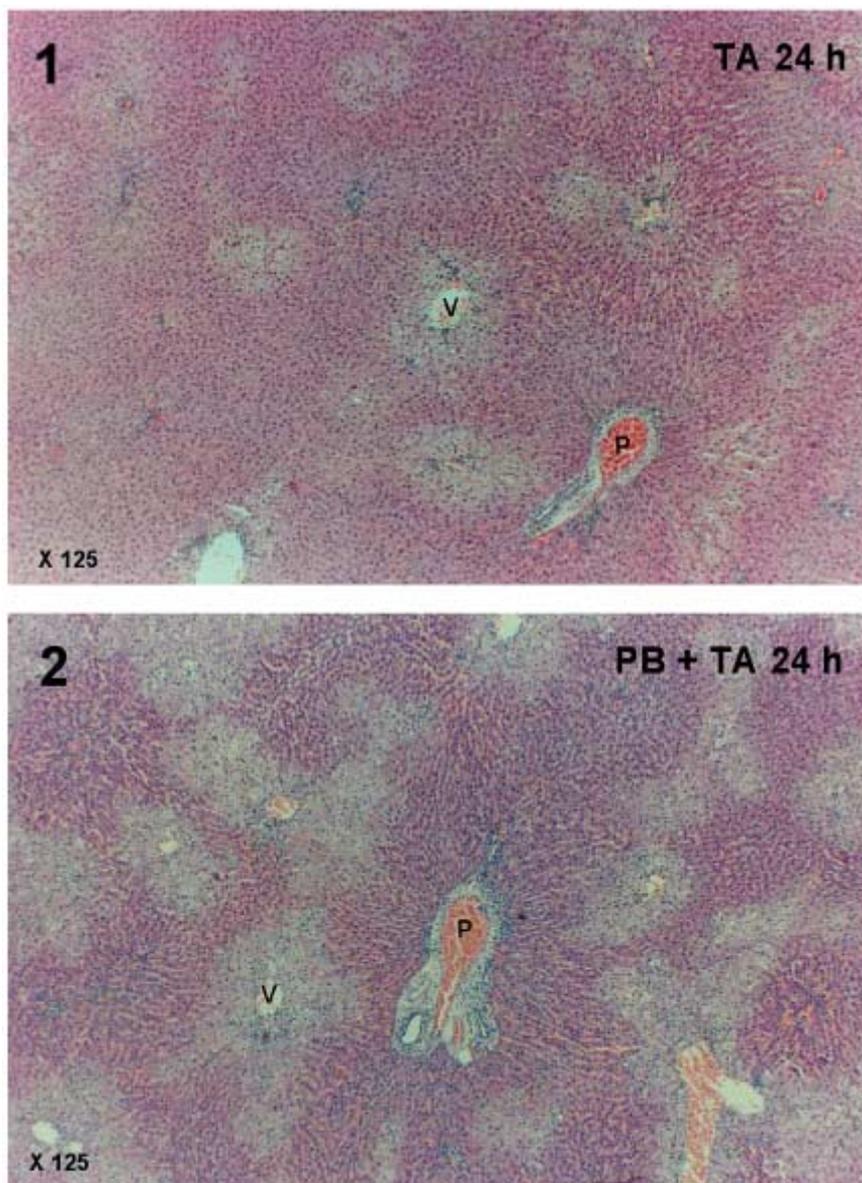


FIGURE 1-2. *Effect of PB-pretreatment on liver morphology following 24 h of TA administration. Liver slices of 5 μ m were obtained and stained from non PB pretreated (Figure 1) and PB pretreated rats (Figures 2). Figures 1 & 2 correspond to liver slices obtained at 24 h of intoxication and show the areas of necrosis surrounding the venous terminal (x 125).*

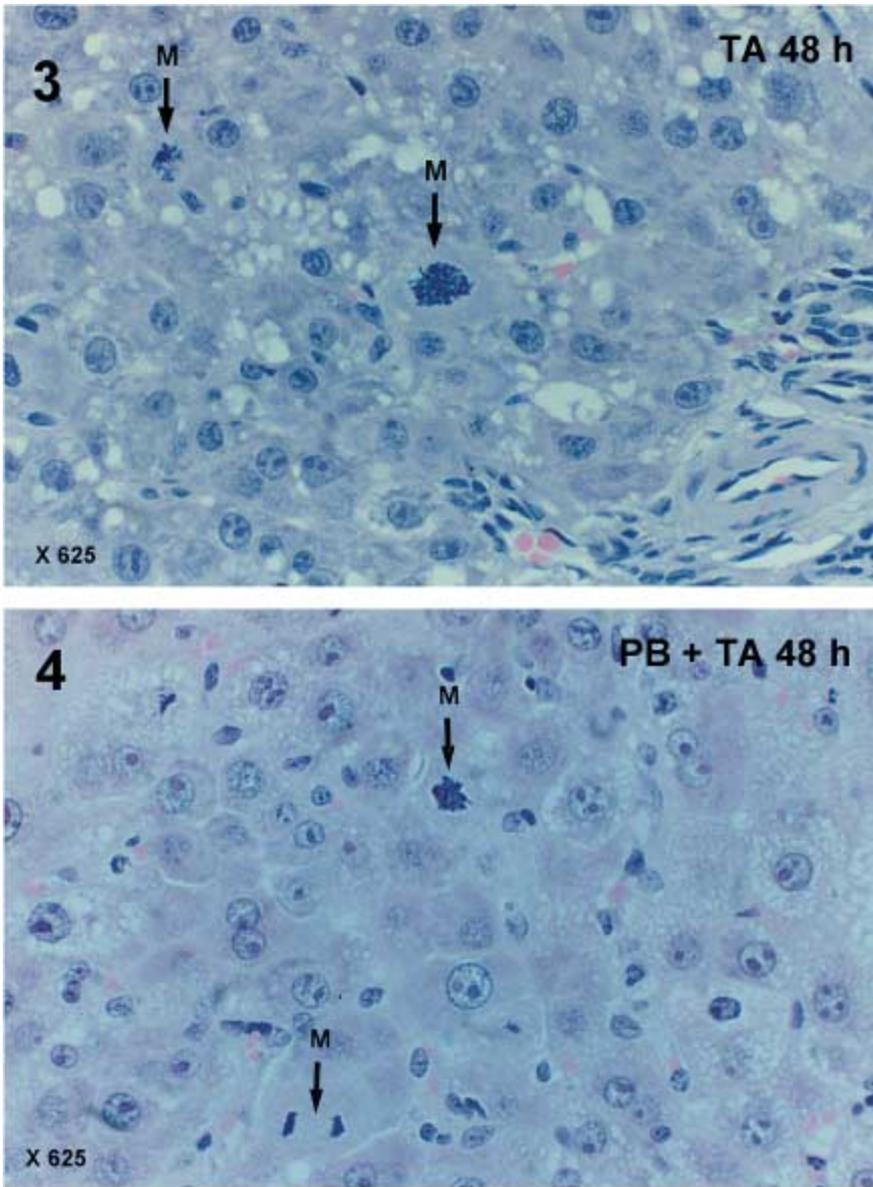


FIGURE 3-4. Effect of PB-pretreatment on liver morphology following 48 h of TA administration. Liver slices of 5 μ m were obtained and stained from non PB pretreated (Figure 3) and PB pretreated rats (Figures 4). Figures 3 & 4 correspond to liver slices obtained at 48 h of intoxication and show cells in mitosis (M) (x 625).

Mitotic Index (MI)

Mitotic index (MI) is defined as the ratio between cells in mitosis and total cells (15). MI, as a marker of cellular proliferation, was determined on slices of 5 μm obtained from rat liver. Slices were stained with hematoxylin and eosin and cells were observed and mitosis quantified under a light microscope. MI was calculated as the number of mitosis against the total number of cells by analyzing the perivenous area of the hepatic acinus. The highest index of proliferation was located in the vicinity of the necrotic region.

The results obtained by counting the cells in mitosis against total cells are shown in Table 1 and are expressed as $\text{MI} \times 10^3$. As hepatocytes from control rats (without treatment) were in the quiescent state, mitosis was very low and MI was undetectable. However, in the case of TA-treated livers, when the peak of cell proliferation was reached at the time point of 48 h of intoxication, the values obtained were 53 ± 3 and 80 ± 6 for non-pretreated and PB-pretreated, respectively. The differences against control were statistically significant. From this time point a progressive decrease was observed in the MI that was still detectable at 96 h of TA administration. PB-pretreatment, without TA, induced a detectable MI, but this effect disappeared progressively when PB was no longer administered.

TABLE 1. *Effect of PB-pretreatment on mitotic index (MI) in liver slices of rats at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration*

Time (h)	PB	TA	PB + TA
	MI $\times 10^3$		
0	2 ± 0.3	Undetectable	2 ± 0.2
12	1 ± 0.1	Undetectable	1 ± 0.1
24	1 ± 0.1	Undetectable	2 ± 0.2
48	Undetectable	53 ± 3^a	80 ± 6^{ab}
72	Undetectable	46 ± 4^a	60 ± 6^{ab}
96	Undetectable	11 ± 1^a	17 ± 2^{ab}

Mitotic index (MI) was calculated as the ratio of number of mitosis per cell density, according to the method of Simpson et al. (1992). Data expressed as means \pm SD are mean of 15 values, either the number of cells or the number of mitosis. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

Serum parameters of thioacetamide hepatotoxicity

One of the symptoms of liver necrosis is the appearance in serum of hepatic enzymes. Isocitrate dehydrogenase (ICDH) is an NADPH generating enzyme mainly located in the perivenous area of the hepatocytes. ICDH activity is used as a parameter of hepatocellular damage to measure the severity of centrilobular necrosis *in vivo*. Serum ICDH is the best marker for perivenous necrosis since aspartate and alanine aminotransferases are mainly located in the periportal space (27). The effect of PB pre-treatment in ICDH activity on rat serum obtained at 0, 12, 24, 48, 72 & 96 h after TA administration is shown in Figure 5. The peak of enzyme activity in both groups, PB untreated or PB pretreated, was observed at 24 h, but in the case of PB-pretreated samples a significant increase was detected, which indicates that the extent of necrosis induced by thioacetamide was markedly increased by the effect of PB-pretreatment. This enhanced severity of TA-induced injury by the effect of PB was also described in previous results from our group (4) and from others (28).

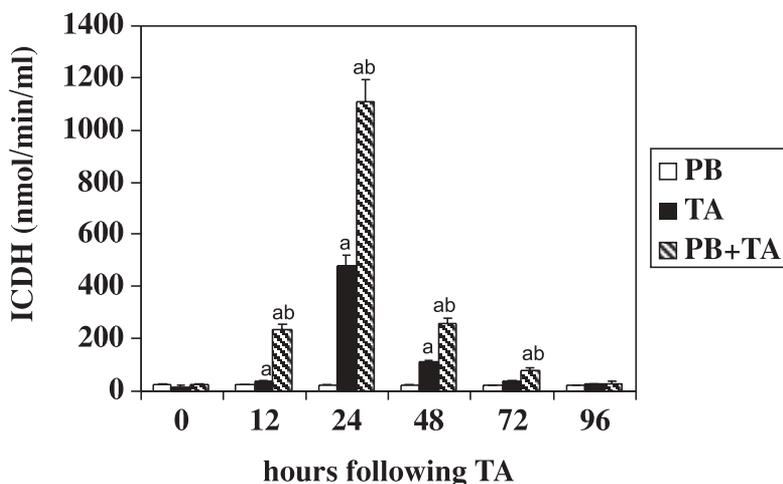


FIGURE 5. Effect of PB pre-treatment on ICDH activity in rat serum. Samples of blood were obtained from rats untreated or pretreated with PB at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as nmol per min per ml of serum and are the mean \pm SD of four experimental determinations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

The levels of total bilirubin ($\mu\text{g/ml}$) in serum obtained from PB untreated and PB-pretreated rats were determined at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. The release of bilirubin to serum is a marker of liver disease. In our experiments the levels of bilirubin increased markedly with a profile parallel to that obtained for ICDH activity, although the peak of serum bilirubin when compared to that of ICDH was delayed, and appeared at 48 h of intoxication (Figure 6).

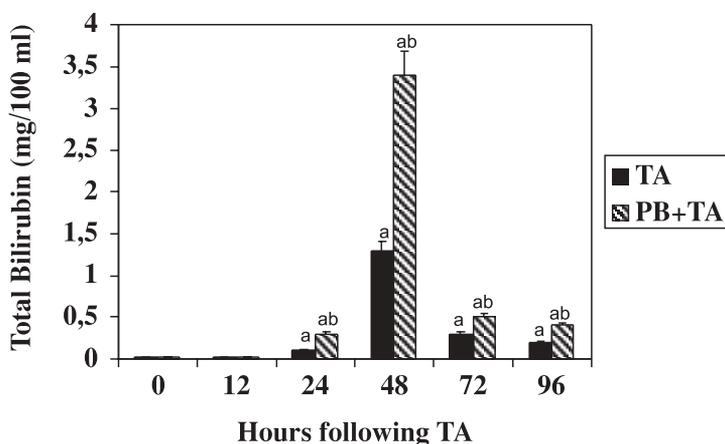


FIGURE 6. Effect of PB pre-treatment on the levels of total bilirubin in rat serum. Samples of blood were obtained from rats untreated or pretreated with PB at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as mg/100 ml of serum and are the mean \pm SD of four experimental determinations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

The concentration of α -fetoprotein (AFP), expressed as ng/ml was assayed on serum of rats that underwent or not a PB pre-treatment at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA (Figure 7). AFP is a glycoprotein whose gene expression occurs in the yolk sac, in the fetal liver and gut and in the adult liver during regeneration and tumorigenesis (29). Our results show that a significant increase in AFP was detected in rat serum at 12 h of TA intoxication, which remained high until 72 h. In serum of PB-pretreated rats the increase in AFP following TA was higher and remained high until 96 h of intoxication.

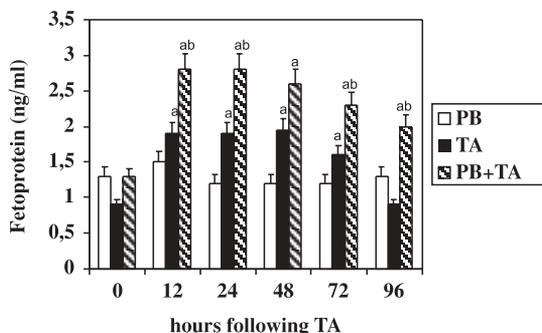


FIGURE 7. Effect of PB pre-treatment on the levels of α -fetoprotein in serum of rats. Samples of blood were obtained from rats untreated or pretreated with PB at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as ng/ml of serum and are the mean \pm SD of four experimental determinations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

An enhancement in the concentration of TBARS is a marker of oxidative stress and lipoperoxidation, which is a consequence of drug metabolism. Figure 8 shows the levels of TBARS determined in liver homogenates of rats at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h of TA administration either in PB untreated or pretreated rats. TBARS increased significantly at 24 of intoxication. In PB-pretreated liver, the levels of TBARS levels were higher and differences against untreated were significant.

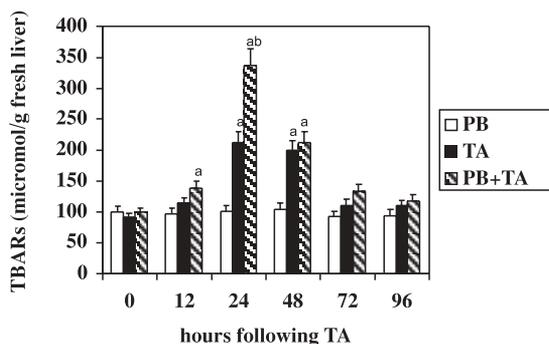


FIGURE 8. Effect of PB pre-treatment on the levels of TBARS concentration in rat liver homogenates. Samples of liver were obtained from rats untreated or PB-pretreated animals at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as μ mol/g of liver and are the means \pm SD of four experimental observations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

Parameters related to thioacetamide oxidative metabolism

As TA is not toxic *per se*, its intermediary metabolism is obligatory for its hepatotoxicity. Microsomal monooxygenases are responsible for its oxidation in sulfoxide and sulfone derivatives. In a previous study of our group, it was demonstrated that the basal activity of FMO underwent age-related changes (11, 30). After TA administration FMO activity was induced as early as at 12 h of intoxication preceding the peak of necrosis, and the peak of lipoperoxidation. Figure 9 shows the activity of this enzyme system (nmol/min/mg protein), which underwent biphasic changes showing a marked decrease at 24 h, just at the time point of necrosis. Necrosis destroyed the perivenous area, the area where FMO is mainly located. PB-pretreatment markedly increased the activity of this enzyme system and the increase was detected even in samples of control livers.

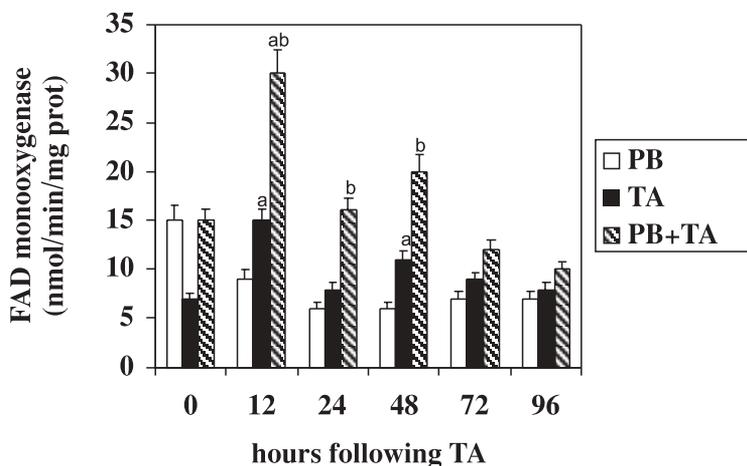


FIGURE 9. Effect of PB pre-treatment on the activity of FMO in rat liver homogenates. Samples of liver were obtained from rats untreated or PB-pretreated animals at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as nmol/min/mg of protein and are the means \pm SD of four experimental observations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

Figure 10 shows the effect of PB pre-treatment on *O*-dealkylation of pentoxiresorufin expressed as pmol/min/mg protein, determined,

as a marker of CYP 2B activity, in the microsomal fraction of homogenates from rat liver obtained at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. In the experimental conditions of the present study, PB pretreatment increased by more than six fold the activity of this enzyme. However, this enhanced activity decreased at 12 and 24 h of PB withdrawal when TA was not administered, in such way that at 48 h the levels reached the basal values (data not shown). TA by itself did not exert any effect on this enzyme activity.

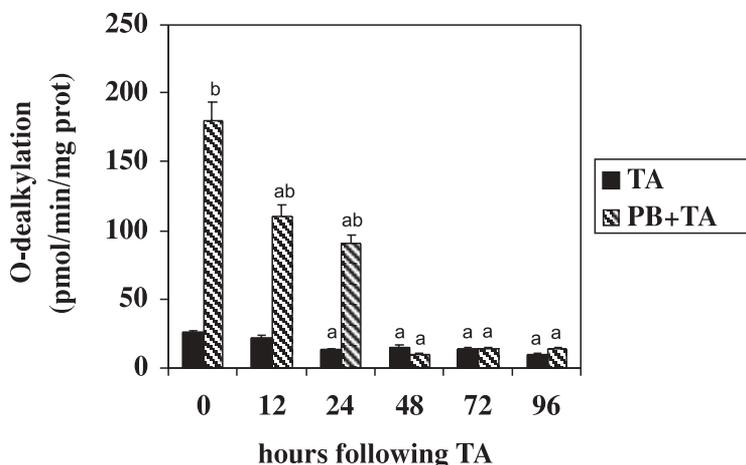


FIGURE 10. Effect of PB pretreatment on the O-dealkylation of pentoxiresorufin in rat liver homogenates. Samples of liver were obtained from rats untreated or PB-pretreated animals at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA administration. Results are expressed as pmol/min/mg protein and are the means \pm SD of four experimental observations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

Flow Cytometric Analysis

The sequence of post-necrotic proliferation of hepatocytes was also detected in isolated liver cells at different time points (0, 3, 12, 24, 48, 72 and 96 h) following thioacetamide, by measuring the ploidy and DNA distribution in the cell cycle phases. In DNA histograms (Figure 11) the values are expressed as the relative number of cells against the fluorescence (FL2A) emitted by the propidium iodide-DNA complex, obtained by flow cytometry. In Figure 12 is shown the

quantification of the DNA histograms relative to the hepatocyte populations: diploid (2C), poliploid (4C + 8C) and in phase of DNA synthesis, S1 (G1 → G2) + S2 (G2 → G4). Remarkable changes were obtained at 48 h, such as a 12 (TA) and 17 (PB + TA) fold increase in DNA synthesis and parallel but opposite changes in diploid and tetraploid populations. 4C diminished parallel to the increase in 2C. The peak of hepatocellular regeneration was at 48 h, when the highest synthesis of DNA was detected, and at this moment the ploidy profile appeared equal to that of fetal hepatocytes.

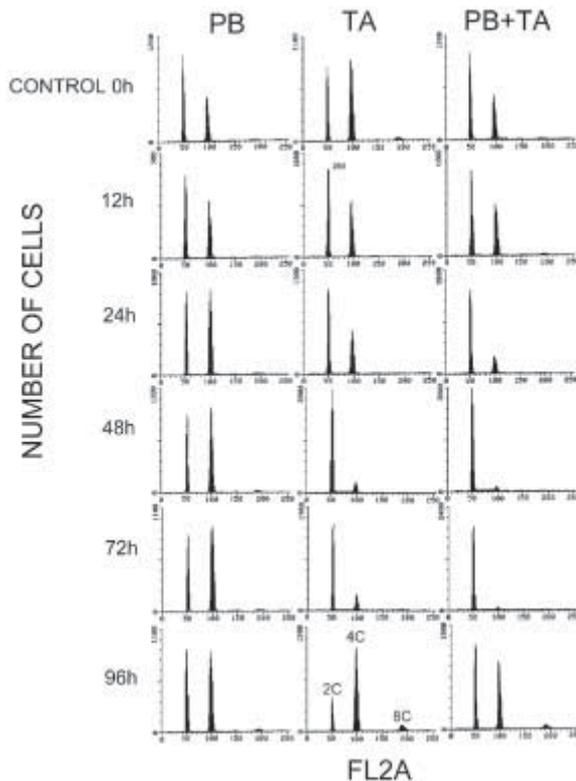


FIGURE 11. *Histograms of DNA content and ploidy by flow cytometry. The relative number of stained cells (vertical axis) was plotted against DNA ploidy. 2C for diploid, 4C for tetraploid and 8C for octoploid populations (horizontal axis). To follow the time course of alterations in genomic DNA distribution, hepatocytes were obtained from PB untreated or pretreated at 0, 3, 12, 24, 48, 72 and 96 h following TA. Isolated and trypsinized hepatocytes were processed as indicated in the kit kinesis for distribution of DNA in the cell populations in the cell cycle. Quantitative analysis is shown in Figure 12.*

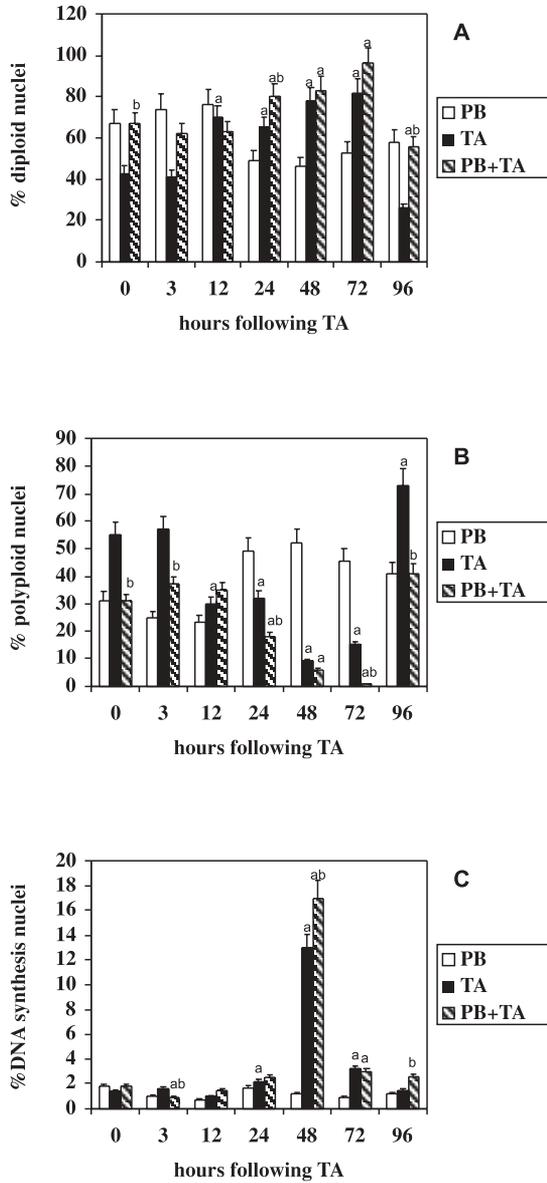


FIGURE 12. Quantitative analysis of DNA histograms in Figure 11. (A) diploid (2C) population; (B) cells synthesizing DNA and (C) tetraploid and octoploid populations (4C + 8C). Results are expressed as percentage of total are the means \pm SD of four experimental observations from four rats. Statistics were (a) values against control; (b) PB + TA against TA.

DISCUSSION

In response to the action of hepatotoxic drugs, the liver develops hepatocellular necrosis, which is immediately followed by hepatocellular regeneration and restoration of the liver function (31-33). In the present investigation the effect of a previous treatment with PB was assayed on liver necrosis and hepatocellular regeneration induced by TA. The location of the liver injury induced by TA in the perivenous acinar region is caused by the higher abundance of smooth endoplasmic reticulum in this area and the greater ability to oxidize xenobiotics and to produce reactive intermediates. The extent of the necrotic area was larger in the case of PB-pretreatment, but the intraacinar location of injury apparently did not change. It is well known that PB induces the proliferation of the smooth endoplasmic reticulum, which is mainly located in the perivenous area (34). PB has the ability to induce the expression of several isozymes of the cytochrome P450-dependent microsomal system, such as P450 2B. One aim of this study was to evaluate the interaction between PB and TA, against the hepatocellular damage and post-necrotic hepatocyte proliferation. TA is a well known necrogenic agent, which is apparently metabolized by the FMO (35, 36). The necrogenicity of TA is a consequence of its biotransformation in free radical derivatives, by the microsomal monooxygenases mentioned previously. As PB induces the proliferation of the smooth endoplasmic reticulum, it may also induce all the microsomal systems that are attached to their membranes such as FMO and CYP. PB also induces the expression of drug metabolizing enzymes, mainly those that are cytochrome P 450 2B dependent. This induction affects drug metabolism and clearance, drug toxicity and carcinogenicity (26).

The results obtained by our group in the present and previous studies demonstrate that PB pretreatment increases FMO activity. The higher degree of necrosis induced by PB-pretreatment may be due to the enhancement of enzyme activities of both FMO and CYP2B. The contribution of each of these two systems to TA metabolism, needs to be clarified in future studies at the level of transcription and translation by using specific inhibitors.

Analyzed in the present study was the influence of PB on TA-induced liver injury and regeneration both at morphological and at flow cytometric levels. On liver slices of 5 μm stained with hematoxylin & eosin, the following observations were made: first, that PB-pretreatment does not modify the intraacinar location of the necrotic area induced by TA, which indicates that the microsomal monooxygenase system responsible for TA biotransformation are selectively located in the perivenous region. Other hepatotoxic agents, such as cocaine, when administered to PB-pretreated mice, the location of liver injury shift from the perivenous to the periportal area (3). Second, that PB-pretreatment increases the severity of the damage, which can be clearly observed in Figures 1 & 2, obtained by light microscopy. As TA is not toxic *per se*, the increase in the extent of toxicity demonstrates that the microsomal systems, responsible for its oxidative metabolism, are induced by PB-pretreatment (4).

These results are in agreement with those obtained in serum as parameters of necrosis. The assay of serum isocitrate dehydrogenase showed that the time point of maximum necrosis appeared at 24 h following thioacetamide in both experimental groups: TA and PB + TA. However, the extent of damage was significantly more pronounced in the PB-pretreated group. Other parameters of liver injury, such as bilirubin and TBARS, showed parallel results.

Liver regeneration is an essential process that permits the repair of the hepatic tissue and the restoration of liver function following liver injury or surgical resection. In our experiments, the extent of liver regeneration induced by TA was parallel to the severity of liver injury. By flow cytometry was determined the distribution of hepatocyte populations with respect to DNA ploidy and DNA synthesis. Population in S phase peaked at 48 h of intoxication, both in PB untreated and pretreated groups. These results agree with those obtained by counting the mitosis as mitotic index. Our results, obtained by flow cytometry, permitted us to detect, not only the population that undergoes DNA replication, but also the various stages of cell proliferation: G1 (2C) and G2 (4C + 8C). In this way it can be observed that when regeneration processes starts, diploid population increases, while tetraploid and octoploid decreases (10), and the profile of liver cell ploidy appears similar to that found in fetal hepatocytes. PB-pretreatment not only increased DNA synthesis

but also affected the other stages of the cell cycle. AFP levels, another parameter related to the proliferative state of the cell, underwent significant changes due to PB-pretreatment.

On the basis of the present results, it is concluded that PB administration to rats previous to TA intoxication, potentiates the hepatotoxicity and the post-necrotic response induced by TA, but has no influence on the location of the intraacinar injury. The recovery of organisms suffering from severe liver damage depends heavily on the ability of the remaining hepatocytes to proliferate and replace the liver function. Death of the organism usually occurs when the regenerating ability of the liver is compromised owing to heavy damage to the liver. The current approach to therapy aims only to block additional liver injury from hepatotoxicants or hepatic disease. If hepatocellular regeneration and tissue repair could be stimulated after hepatic damage by a therapeutically compatible mechanism, the prevention of death arising from serious liver damage is a distinct possibility.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dolores Velasco Pérez for her excellent technical assistance and Professor Erik Lundin for his helpful criticism in the preparation of this manuscript. This study was supported by grants from SAF-2000-128 and BFI2002-02496.

REFERENCES

- (1) CONNEY, A. H. (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19: 317-366.
- (2) WAXMAN, D. J.; AZAROFF L. (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P-450 expression. *Biochem. J.* 284: 577-592.
- (3) CASCALES, M.; ÁLVAREZ, A. M.; GASCÓ, P.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; BOSCA, L. (1994) Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed cell death of hepatocytes. *Hepatology* 20: 992-1001.
- (4) ZARAGOZA, A.; ANDRÉS, D.; SARRIÓN, D.; CASCALES, M. (2000) Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem. Biol. Interact.* 124: 87-101.

- (5) LANDON, E. J.; NAUKAM, R. J.; RAMA SASTRY, B. V. (1986) Effect of calcium channel blocking agents on centrilobular necrosis in liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.* 35: 697-705.
- (6) CASCALES, M.; MARTÍN-SANZ, P.; ÁLVAREZ, A. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; BOSCA, L. (1992) Isozymes of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis. *Hepatology* 16: 232-240.
- (7) AMMON, R.; BERNINGER, H.; HAAS, I. G. (1967) Thioacetamid sulfoxid, ein Stoffwechselproduct der thioacetamid. *Arzeimittel Forschung.* 17: 521-523.
- (8) DYROF, M. C.; NEAL, R. A. (1981) Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res.* 41: 3430-3435.
- (9) WANG, T., SHANKAR, K.; RONIS, M. J.; MEHENDALE, H. M. (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 473-479.
- (10) DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; BOSCA, L.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; ÁLVAREZ, A. M.; CASCALES, M. (1993) Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 18: 912-918.
- (11) SANZ, N.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; CASCALES, M. (1998) Aging delays the post-necrotic regeneration of liver function. *Biofactors* 8: 103-109.
- (12) AIDA, K.; NEGISHI, M. (1991) Posttranscriptional regulation of coumarin 7-hydroxylase induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole. *Biochemistry* 30: 8041-8045.
- (13) WHITLOCK, J.P. (1986) The regulation of cytochrome P-450 gene expression. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 333-369.
- (14) SANZ, N.; DíEZ-FERNÁNDEZ, C.; ÁLVAREZ, A. M.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; CASCALES, M. (1999) Age-related changes on parameters of experimentally-induced liver injury and regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 40-49.
- (15) SIMPSON, J. F.; DUTT, P. L.; PAGE, D. L. (1992) Expression of mitosis per thousand cells and cell density in breast carcinoma: a proposal. *Hum. Pathol.* 26: 608-611.
- (16) GOLDBERG, D. M. ; ELLIS, G. (1997) Isocitrate dehydrogenase EC 1.1.1.42. In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Grabl, M., editors. *Methods in Enzymatic Analysis*, 3rd ed, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 3, pp. 183-190.
- (17) TALAFANT, E. (1956) Properties and composition of bile pigment direct diazo reaction. *Nature.* 178: 312.
- (18) WEPSIE, H. T. (1981) Alpha-fetoprotein: Its quantification and relationship to neoplastic disease. In: Kirkpatrick, A., Nakamura, R., editors, *Alpha-fetoprotein, Laboratory procedures and Clinical Applications*. New York: Masson Pub, pp. 115-129.
- (19) BARNES, G.; DANNA, A.; MICELI, C.; MASSIE, D.; LOOS, V.; SHAW, V. (1987) An automated fluorescent enzyme immunoassay for the determination of human alpha-fetoprotein. Abbott Laboratories, Diagnostic Division, North Chicago IL. AACC Meeting. San Francisco.

- (20) BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- (21) NIEHAUS, W. G. JR.; SAMUELSSON, B. (1968) Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.* 6: 126-130.
- (22) SUM, C. Y.; KASPER, C. B. (1982) Mixed-function amine oxidase of the rat hepatocyte nuclear envelope. Demonstration and effects of Phenobarbital and 3-methylcholantrene. *Biochem. Pharmacol.* 31: 69-72.
- (23) HONKAKOSKI, P.; LANG, M. A. (1989) The mouse liver phenobarbital-inducible P450 system. Purification, characterization and differential inducibility of four PB-inducible cytochrome P450 isozymes from D2 mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 273: 42-57.
- (24) SEGLEN, O. (1993) Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. In: Tysson, C. A., Frazier, J. M., editors. *Methods in Toxicology*. New York: Acad Press; vol. 1A, pp. 231-261.
- (25) VINDELOV, L. L.; CHRISTENSEN, I. J.; NISSEN, N. I. (1983) A detergent trypsin method for preparation of nuclei by flow cytometry. *Cytometry* 3: 323-327.
- (26) JIRTLE, R. L.; MEYER, S. A. (1991) Liver tumor promotion: effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor-beta 1 expression. *Dig. Dis. Sci.* 36: 659-668.
- (27) CHUNG, Y. H.; KIM, J. A.; SONG, B. C.; SONG, I. H.; KOH, M. S.; LEE, H. C.; YU, E.; LEE, Y. S.; SUH, D. J. (2001) Isocitrate dehydrogenase as a marker of centrilobular hepatic necrosis in the experimental model of rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16: 328-32.
- (28) KIM, H. K.; BAE, J. H.; CHA, S. W.; HAN, S. S.; PARK, K. H.; JEONG, T. C. (2000) Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. *Toxicol. Lett.* 114: 225-235.
- (29) JIN, D. K.; VACHER, J.; FEUERMAN, M. H. (1998) Alpha-fetoprotein gene sequences mediating Afr2 regulation during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 8767-8772.
- (30) SANZ, N.; DIEZ-FERNÁNDEZ, C.; ANDRÉS, D.; CASCALES, M. (2002). Hepatotoxicity and aging: Endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18-, & 30- month old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587: 12-29.
- (31) MICHALOPOULOS, G. K. (1990) Liver regeneration: Molecular mechanisms of growth control. *FASEB. J.* 4: 176-187.
- (32) TAUB, R. (1996) Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB. J.* 10: 413-427.
- (33) ASSY, N.; MINUK, G. Y. (1997) Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J. Hepatol.* 26: 945-952.
- (34) KATZ, N. R. (1993) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J. Nutr.* 122: 843-849.

- (35) DE-FERREYRA, E. C.; DE-FENOS, O. M.; CASTRO, J. A. (1984). Prevention of thioacetamide-induced liver necrosis by prior administration of substrates of flavin-containing monooxygenase. *Toxicol. Lett.* 18: 127-131.
- (36) CHIELI, E.; MAVALDI, G. (1984) Role of microsomal FAD-containing monooxygenase in liver toxicity of thioacetamide-S-oxide. *Toxicology* 31: 45-52.

————— *Artículo original* —————

Los receptores de nucleótidos P2Y reducen la entrada de calcio inducida por despolarización en terminales sinápticos de cerebro medio de rata

PATRICIA MARÍN GARCÍA ^{1*}, ROSA GÓMEZ VILLAFUERTE ^{2*}
y JAVIER GUALIX ¹

¹ *Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.* ² *Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid.*

** Estos autores contribuyeron igualmente*

RESUMEN

Se han llevado a cabo estudios para determinar la presencia y función de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio. Ensayos inmunoquímicos han mostrado la expresión, en dichas terminales, de los receptores P2Y₂ y P2Y₄. La activación de estos receptores por sus agonistas selectivos lleva a una reducción en la entrada de calcio en las terminales, inducida por agentes despolarizantes. Este efecto es similar al que producen agonistas de otros receptores metabotrópicos, como los A₁ de adenosina o los GABA_B, conocidos por su papel en el control presináptico de la liberación de neurotransmisores.

La activación de los receptores P2Y conduce asimismo a una disminución en los niveles intrasinaptosomales de AMPc, por lo que estos receptores parecen estar acoplados negativamente a la actividad de la adenilato ciclasa. Sin embargo, se plantea como hipótesis que los receptores P2Y pudiesen actuar reduciendo la entrada de calcio en las terminales a través de la disociación de la proteína G a la que están acoplados, y la posterior acción del dímero βγ sobre canales de calcio dependientes de voltaje.

Palabras clave: Receptores P2Y.—Terminales sinápticas.—Regulación presináptica.

SUMMARY

Nucleotide P2Y receptors reduce depolarization-evoked calcium entry into rat midbrain synaptic terminals

Studies were carried out to determine the presence and function of P2Y receptors in synaptic terminals from rat midbrain. Immunochemical essays have shown the expression of the nucleotide P2Y₂ and P2Y₄ receptors. Activation of these receptors induces a reduction of the calcium entrance into the terminals, when stimulated with depolarising agents. A similar effect is produced by agonists of metabotropic receptors, such as the adenosine A1 or GABA_B receptors, which are well known for its role in the presynaptic control or transmitter release.

Activation of the P2Y receptors also triggers a reduction in the intrasynaptic cAMP concentration. Thus, these receptors seem to be negatively coupled to adenylate cyclase activity. However, we postulate that P2Y receptors are able to reduce calcium entrance into the terminals by the activation of the corresponding G protein, dissociation of the trimer and action of the $\beta\gamma$ subunits on voltage activated calcium channels.

Key Words: P2Y receptors.—Synaptic terminals.—Presynaptic regulation.

INTRODUCCIÓN

Los terminales sinápticos contienen una gran variedad de receptores que son activados por neurotransmisores liberados desde el propio terminal o desde otros terminales o células adyacentes. Entre estos neurotransmisores se encuentran los nucleótidos que, una vez secretados al medio extracelular, regulan multitud de funciones en el sistema nervioso central y periférico (1). Para llevar a cabo su función neurotransmisora, estos compuestos se unen de manera específica a receptores de membrana denominados P2 (2). Los receptores P2 se clasifican en dos grandes grupos: receptores ionotrópicos, P2X, que constituyen canales iónicos activados por ligando y de los que se han clonado, hasta la fecha, siete subunidades distintas (P2X₁₋₇); o receptores metabotrópicos, P2Y, que forman parte de la superfamilia de receptores de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G, y de los cuales se han descrito ocho subtipos diferentes (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}).

Mediante el empleo de técnicas inmunoquímicas, de western blot o por ensayos funcionales, se ha demostrado la existencia de recep-

tores P2X presinápticos, fundamentalmente los constituidos por los subtipos P2X₃ y P2X₇ (3-7), aunque otras subunidades, como la P2X₁, P2X₂ o P2X₄, podrían también tener una localización presináptica en diferentes regiones del SNC (8-12).

Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la funcionalidad de los receptores P2X presinápticos, demostrando su presencia en terminales de cerebro medio de tipo GABAérgico, colinérgico o glutamatérgico, donde su activación conduce a la liberación del correspondiente neurotransmisor (13, 14, 15). Las terminales aminérgicas de los ganglios basales también contienen receptores ionotrópicos de ATP capaces de inducir, tras su activación, incrementos en la concentración de calcio en el interior de la terminal (16).

La facilitación de la liberación de neurotransmisores por receptores P2X presinápticos ha sido descrita también por otros autores mediante ensayos electrofisiológicos llevados a cabo en neuronas de la médula espinal o el tallo cerebral (17, 18, 19).

Aunque la existencia de receptores P2X presinápticos y su papel en el control de la liberación de neurotransmisores ha sido firmemente establecida por la abundante evidencia experimental, este no es el caso de los receptores P2Y. Diversos estudios sugieren que, en determinadas localizaciones del SN, el ATP y otros nucleótidos podrían actuar presinápticamente inhibiendo la liberación de neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de receptores de tipo P2Y (20, 21).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo ha consistido en investigar la presencia de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio de rata y su posible papel en el control de la entrada de calcio inducida por la despolarización de dichas terminales.

MÉTODOS

Preparación de sinaptosomas

Los terminales sinápticos o sinaptosomas se obtuvieron a partir de ratas Wistar macho adultas, que fueron sacrificadas por disloca-

ción cervical y posterior decapitación. Tras ello, se extrajo el cerebro y se lavó rápidamente con medio de aislamiento (sacarosa 0,32 M, TES 5 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,4) a 4° C. A continuación se separó el cerebro medio de la corteza y el cerebelo con ayuda de un bisturí. El denominado cerebro medio incluye ganglios basales, hipocampo, amígdala, diencéfalo, mesencéfalo y bulbo raquídeo. Los sinaptosomas utilizados en los experimentos de medida de Ca^{2+} y medida de AMPc se obtuvieron a partir de este área cerebral, mediante el protocolo descrito por Pintor y col. (22). Los sinaptosomas empleados en los ensayos inmunocitoquímicos fueron sometidos a una etapa adicional de purificación, empleando un gradiente discontinuo de percoll, según el método descrito por Dunkley y col. (23).

Determinación fluorimétrica de Ca^{2+} intrasinaptosomal en poblaciones

La determinación de la concentración de calcio citosólico libre en los sinaptosomas se llevó a cabo empleando el indicador fluorescente Fluo-3. Los sedimentos de sinaptosomas, conteniendo 1 mg de proteína, se resuspendieron en 500 μL de medio de incubación atemperado a 37° C. La composición del medio de incubación empleado fue la siguiente: NaCl 122 mM, KCl 3,1 mM, MgSO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, NaHCO_3 5 mM, HEPES 20 mM, glucosa 10 mM y albúmina de suero bovino (BSA) 1 g/L, pH 7,4. Los sinaptosomas se mantuvieron en agitación durante 5 minutos a 37° C. Transcurrido este tiempo, se incubaron con Fluo-3 acetoximetil éster (4 μM) y CaCl_2 (1,33 mM), durante 25 minutos, en agitación y a 37° C. Posteriormente, los sinaptosomas se lavaron por centrifugación en una microfuga durante 1 minuto a 16.000 x g, retirando el sobrenadante, y resuspendiendo el sedimento en 500 μL de medio de incubación sin BSA. Finalmente, esta suspensión se añadió a una cubeta de fluorímetro conteniendo 1 mL del mismo medio de incubación, suplementado con CaCl_2 (concentración final de Ca^{2+} : 1,33 mM). El ensayo se inició, una vez estabilizada la señal de fluorescencia basal (aproximadamente tras 1 minuto), con la adición simultánea de 4-aminopiridina (4AP) 1 mM y el correspondiente agonista P2Y. Las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión de fluorescencia se recogió a 524 nm. Los datos fueron registrados a intervalos de 0,5 segundos.

La concentración de Ca^{2+} intrasinaptosomal fue calculada a partir de las medidas de fluorescencia, empleando la ecuación de Grynkiewicz y col. (24). El valor de la constante de disociación para el complejo Ca^{2+} /Fluo-3 a 37° C y pH 7,4 se estimó en 400 nM.

Determinación de los niveles de AMPc intrasinaptosomal

Los sedimentos de sinaptosomas, conteniendo 2 mg de proteína, se resuspendieron en 1 mL de medio de incubación (composición mM: NaCl 122, KCl 3,1, MgSO_4 1,2, KH_2PO_4 0,4, NaHCO_3 5, HEPES 20, y glucosa 10, pH 7,4) atemperado a 37° C y se mantuvieron en agitación durante 5 minutos a esa temperatura. Transcurrido este tiempo, se incubaron con 50 μM de rolipram (un inhibidor específico de la fosfodiesterasa de AMPc) y CaCl_2 1,33 mM, durante 30 minutos a 37° C. Finalmente, se estimularon con los diferentes compuestos a ensayar durante los tiempos indicados en cada caso. La estimulación se detuvo añadiendo una mezcla de ácido perclórico y EDTA para producir el lisado de las membranas, y la muestra se mantuvo en estas condiciones durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente, el lisado de sinaptosomas se centrifugó a 13.000 x g en una microfuga durante 2 minutos a 4° C y a continuación se neutralizaron las muestras con una mezcla de KOH/TEA y se congelaron hasta su procesamiento. Los niveles de AMPc se determinaron utilizando un sistema de radioinmunoensayo suministrado en un kit por Amersham Biosciences.

Ensayos inmunocitoquímicos

Los sinaptosomas purificados por gradiente de percoll se resuspendieron en 5 mL de medio PBS (mM: NaCl 137, KCl 2,6, KH_2PO_4 1,5, Na_2HPO_4 8,1; pH 7,4) y se colocaron sobre un cubreobjetos previamente tratado con poli-L-lisina, permaneciendo así durante una hora a 37° C para permitir la adhesión de los sinaptosomas al vidrio. Una vez adheridos, los sinaptosomas se fijaron con *p*-formaldehído al 4 por 100 durante 15 minutos, se lavaron dos veces con medio PBS y se incubaron una hora, a temperatura ambiente, con una solución de bloqueo conteniendo BSA al 3 por 100, Triton X-100 al 0,1 por 100 y suero de cabra al 5 por 100 en PBS, con objeto de eliminar una posi-

ble unión inespecífica del anticuerpo. Tras dos lavados con PBS/BSA, los sinaptosomas se incubaron durante una hora a 37° C con el correspondiente anticuerpo primario: anti-P2Y₁ (1/100), anti-P2Y₂ (1/100), anti-P2Y₄ (1/100), anti-P2Y₆ (1/100) o anti-P2Y₁₁ (1/100), todos ellos desarrollados en conejo. Los anticuerpos empleados no se encuentran disponibles comercialmente y fueron cedidos para este estudio por Glaxo Wellcome. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS/BSA y se incubaron una hora a 37° C con el anticuerpo secundario: TRITC-anti-IgG de conejo (1:500). Por último, se realizaron tres lavados con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos, empleando un medio de montaje. Los controles se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo pero sustituyendo el anticuerpo primario por el mismo volumen de PBS/BSA.

Análisis de datos

Los datos presentados corresponden a la media \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos dos determinaciones, llevadas a cabo en diferentes preparaciones sinaptosomales. Las comparaciones entre medias se realizaron acudiendo al análisis de la *t* de Student. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

Identificación inmunocitoquímica de receptores P2Y en terminales sinápticas de cerebro medio de rata

Para poner de manifiesto la presencia de receptores P2Y en las terminales sinápticas de cerebro medio, se llevaron a cabo estudios inmunoquímicos, empleando anticuerpos frente a diferentes subtipos de estos receptores: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁.

Tras el análisis de estos experimentos se detectó marcaje positivo para los subtipos P2Y₂ y P2Y₄, como se puede observar en la Figura 1. Aunque, con los anticuerpos empleados, no se detectó ningún inmunomarcaje para los subtipos P2Y₁, P2Y₆ y P2Y₁₁, no se puede descartar la presencia minoritaria de estas subunidades en nuestro

modelo de sinaptosomas o en terminales sinápticas procedentes de regiones más específicas del SNC.

Acción de los agonistas P2Y sobre la entrada de calcio inducida por despolarización de las terminales

Para estudiar la funcionalidad de los receptores detectados, se ensayó el efecto de sus agonistas sobre la entrada de Ca^{2+} provocada por el agente despolarizante 4-aminopiridina (4AP).

Los receptores P2Y_2 y P2Y_4 se caracterizan por ser activados con igual potencia por los nucleótidos de adenina y uracilo, cosa que no ocurre con otros subtipos de receptores P2Y, como los P2Y_1 , P2Y_4 y P2Y_{11-13} , activados preferentemente por las purinas, o el receptor P2Y_{14} , activado específicamente por UDP-glucosa. Por ello, se empleó UTP y UDP para estudiar selectivamente los receptores P2Y_2 y P2Y_4 . Como se observa en la Figura 2, ambos nucleótidos, a una concentración de 100 μM , son capaces de reducir significativamente los incrementos de Ca^{2+} inducidos por 4AP 1mM, siendo los valores medidos en presencia de UDP y UTP, respectivamente, un $93,7 \pm 1,2$ por 100 y un $92,8 \pm 2,2$ por 100 de los observados en situaciones control.

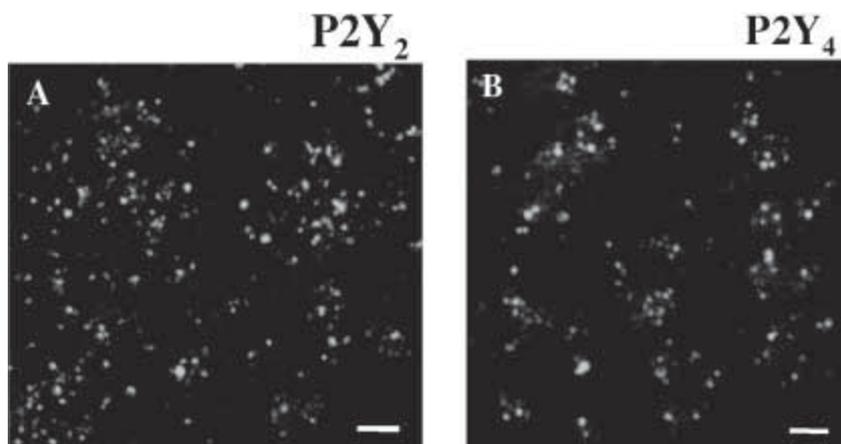


FIGURA 1. Identificación inmunocitoquímica de los receptores P2Y en terminales nerviosas de cerebro medio de rata. En las imágenes de fluorescencia se muestra el marcaje positivo de las terminales de cerebro medio con anticuerpos frente a los receptores P2Y_2 (imagen A) o P2Y_4 (imagen B). En ambos casos, los anticuerpos anti-P2Y se revelaron con isocianato de tetrametilrodamina (TRITC). La barra de escala corresponde a 5 μm .

El 2MeSADP (un agonista selectivo de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂) a 10 μM no produce, sin embargo, efecto alguno. A modo comparativo, se ensayó también el efecto de otros agonistas de receptores metabotrópicos cuya localización presináptica ha sido firmemente establecida. Así, por ejemplo, se estudió el efecto de la ciclohexiladenosina (CHA), un agonista de los receptores A₁; o el baclofén, un agonista selectivo de los receptores GABA_B. Ambos compuestos producen un efecto similar al observado para UTP y UDP, si bien CHA y baclofén fueron capaces de reducir en mayor proporción el incremento de Ca²⁺ inducido por 4AP, siendo los valores medidos en presencia de estos agonistas un 85,1 ± 4,4 por 100 y un 77,7 ± 0,6 por 100 (para CHA y baclofén, respectivamente) de los obtenidos en situaciones control (Figura 2).

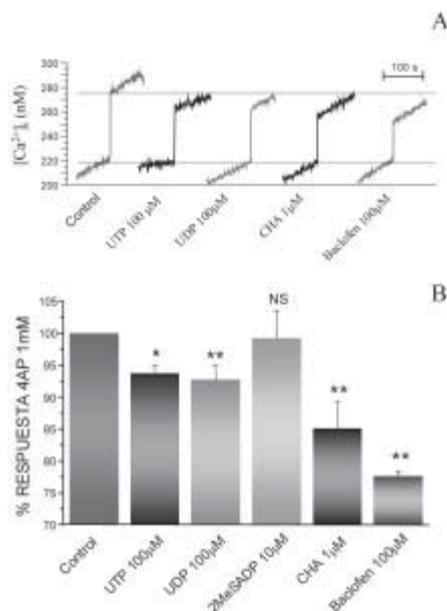


FIGURA 2. Efecto de diversos agonistas sobre las respuestas de calcio inducidas por 4-aminopiridina. (A) Se muestran registros representativos de los incrementos de Ca²⁺ inducidos por la estimulación de las terminales con 4-aminopiridina 1 mM, en ausencia (control) o en presencia de UTP, UDP, ciclohexiladenosina (CHA) o baclofén. En (B) se muestra la respuesta obtenida en presencia de cada uno de los agonistas, como porcentaje con respecto a la respuesta en condiciones control ($\Delta[Ca^{2+}]_i = 40,34 \pm 2,01$ nM), que se ha establecido como el 100 por 100.

Las barras representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos en cuadruplicado ($n = 3-4$). NS, diferencia no significativa con respecto al control ($p > 0,05$); * ($p < 0,05$), respecto al control; ** ($p < 0,01$), respecto al control.

Acción de los agonistas P2Y sobre los niveles intrasínaptosomales de AMPc en terminales sinápticas de cerebro medio de rata

El tratamiento de los sinaptosomas durante 5 minutos con 100 μM de forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, incrementa notablemente los niveles intrasínaptosomales de AMPc, que pasan de $1,15 \pm 0,02$ pmol/mg proteína, en condiciones basales, a $1,89 \pm 0,03$ pmol/mg proteína en presencia del activador (Figura 3).

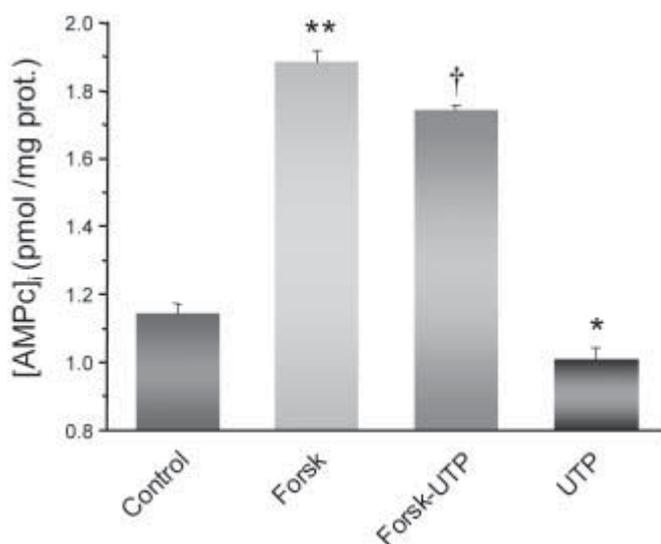


FIGURA 3. Modulación de los niveles intrasínaptosomales de AMPc por el UTP. El tratamiento de los sinaptosomas durante 5 minutos con 100 μM de forskolina incrementa los niveles de AMPc con respecto a los presentes en condiciones basales (control). El UTP, a 100 μM , disminuye los niveles basales del nucleótido cíclico y, asimismo, reduce los incrementos en la concentración de AMPc inducidos por forskolina. Las barras representan la media \pm SEM de dos experimentos en cuadruplicado. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$), respecto al control. † ($p < 0,05$), respecto a la forskolina.

El UTP, a 100 μM , es capaz de disminuir de forma significativa, tanto los niveles basales de AMPc, como los incrementos en la concentración del nucleótido cíclico inducidos por la forskolina (Figura 3). Así, los niveles basales de AMPc se reducen a un valor de

$0,99 \pm 0,04$ pmoles/mg proteína en presencia del UTP, mientras que la forskolina sólo incrementa la concentración del nucleótido cíclico hasta un valor de $1,75 \pm 0,01$ pmol/mg proteína cuando el agonista P2Y está presente en el medio.

DISCUSIÓN

Los ensayos inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de receptores P2Y₂ y P2Y₄ en las terminales nerviosas de cerebro medio de rata. Tras la activación de estos receptores por sus agonistas selectivos, UTP y UDP, se observa una reducción de la entrada de calcio inducida por despolarización con 4-aminopiridina. Este efecto es similar al ejercido por el baclofén y el CHA, ambos agonistas de receptores metabotrópicos (los receptores GABA_B y A1, respectivamente) que son bien conocidos por su efecto inhibitorio en la liberación de neurotransmisores y la profunda depresión que causan en la transmisión sináptica.

En nuestros experimentos se observa un menor efecto de los agonistas P2Y, en la reducción de la señal de calcio en las terminales, cuando se comparan con las acciones ejercidas por los agonistas GABA_B o A1. Sin embargo hay que tener en cuenta que estos últimos receptores están muy ampliamente distribuidos en las terminales de cerebro medio. Así por ejemplo, el receptor GABA_B puede ser detectado mediante inmunocitoquímica en un 62 por 100 de los sinaptosomas (14). El menor efecto de UTP y UDP, comparado con GABA y CHA, podría deberse a una distribución más limitada de los receptores P2Y y su presencia en un menor número de terminales. Aunque el efecto ejercido por los receptores P2Y, en una terminal individual, pudiera ser similar al ejercido por los receptores GABA_B o A1. Para confirmar este hecho serán necesarios futuros estudios de la respuesta mediada por receptores P2Y en terminales sinápticas individuales.

Actualmente está plenamente demostrado el coalmacenamiento de ATP y otros nucleótidos, junto con neurotransmisores clásicos, en vesículas sinápticas y su consecuente secreción exocitótica (25, 26). Por otra parte, los nucleótidos pueden ser también liberados desde células gliales o por la neurona postsináptica, a través de mecanis-

mos no excitóticos en los que presumiblemente están implicados transportadores de la familia ABC (27). Así, los nucleótidos, además de su acción excitatoria (por la facilitación de la liberación de neurotransmisores tras la activación de receptores P2X), podrían ejercer *in vivo* una acción inhibitoria de la transmisión sináptica, mediante su interacción con receptores P2Y, en aquellas áreas o vías cerebrales en las que dichos receptores tengan una presencia abundante.

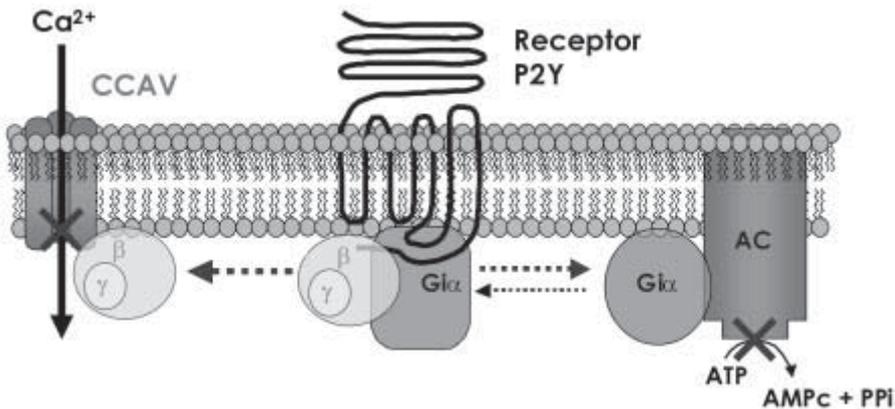


FIGURA 4. Esquema ilustrativo del mecanismo de acción propuesto para los receptores P2Y presinápticos. La activación de los receptores P2Y presentes en las terminales sinápticas conduciría a la activación y consecuente disociación de la proteína G a la que se hallan acoplados (G_i/G_o). La subunidad α actuaría inhibiendo a la adenilato ciclasa y reduciendo los niveles intracelulares del mensajero AMPc, mientras el dímero formado por las subunidades $\beta\gamma$ podría actuar sobre canales de calcio activados por voltaje, reduciendo la entrada de este ion a través de dichos canales y siendo así responsable de la reducción en la señal de calcio observada tras la despolarización de las terminales.

Nuestros estudios demuestran que la activación de los receptores P2Y produce también una disminución de la concentración de AMPc (basal o estimulada con forskolina) dentro del terminal nervioso. Este resultado sugiere el acoplamiento de dichos receptores a proteínas G_i/G_o y la inhibición de la actividad adenilato ciclasa, al igual que ocurre en el caso de los receptores A1 o GABA_B.

Sin embargo, uno de los mecanismos mediante el cual los receptores acoplados a proteínas G pueden modular la entrada de calcio a la célula, es la interacción directa del dímero de subunidades $\beta\gamma$ (libera-

do tras la activación del receptor y la consecuente disociación de la proteína G) con canales de calcio dependientes de voltaje (28). Un mecanismo de este tipo ha sido descrito para receptores P2Y (29).

Por ello, nos planteamos como hipótesis para un futuro estudio si la activación de los receptores P2Y₂ y/o P2Y₄ en las terminales, que lleva a la disociación de la proteína G_i/G_o a la que están acoplados, pudiera permitir que el complejo βγ inhibiese los canales implicados en la entrada de calcio al terminal nervioso tras la despolarización y, por tanto, la liberación de neurotransmisores dependiente de este catión (Figura 4).

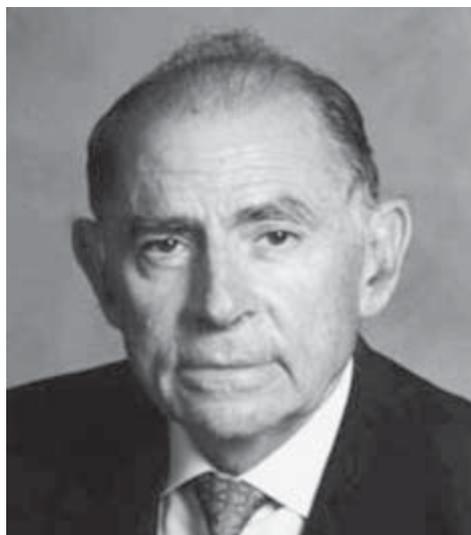
BIBLIOGRAFÍA

- (1) BURNSTOCK, G. (2002) Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin. Med.* 2, 45-53.
- (2) RALEVIC, V. y BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413-492.
- (3) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001). Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X₃ subunits. *Neurosci. Lett.* 301, 159-162.
- (4) DEUCHARS, S. A.; ATKINSON, L.; BROOKE, R. E.; MUSA, H.; MILLIGAN, C. J.; BATTEN, T. F. C.; BUCKLEY, N. J.; PARSON, S. H. y DEUCHARS, J. (2001) Neuronal P2X₇ receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 15, 7143-7152.
- (5) LUNDY, P. M.; HAMILTON, M. G.; MI, L.; GONG, W.; VAIR, C.; SAWYER, T. W. y FREW, R. (2002) Stimulation of Ca²⁺ influx through ATP receptors on rat brain synaptosomes: identification of functional P2X₇ receptor subtypes. *Brit. J. Pharmacol.* 135, 1616-1626.
- (6) SPERLÁGH, B.; KÓFALVI, A.; DEUCHARS, J.; ATKINSON, L.; MILLIGAN, C. J.; BUCKLEY, N. J. y VIZI, S. (2002) Involvement of P2X₇ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 81, 1196-1211.
- (7) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, L.; HERVÁS, C.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; SEN, R. P.; GUALIX, J. y PINTOR, J. (2003) P2X₇ receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem. Res.* 28, 1597-1605.
- (8) VULCHANOVA, L.; RIEDL, M. S.; SCHUSTER, S. J; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. y ELDE, R. (1997) Immunohistochemical study of the P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology* 36, 1229-1242.

- (9) LÊ, K. T.; VILLENEUVE, P.; RAMJAUN, A. R.; MCPHERSON, P. S.; BEAUDET, A. y SÉGUÉLA, P. (1998) Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83, 177-190.
- (10) ATKINSON, L.; BATTEN, T. F. C. y DEUCHARS, J. (2000) P2X₂ immunoreactivity in the dorsal vagal complex and area postrema of the rat. *Neuroscience* 99, 683-696.
- (11) LAUBE, B. (2002) Potentiation of inhibitory glycinergic neurotransmission by Zn²⁺: a synergistic interplay between presynaptic P2X₂ and postsynaptic glycine receptors. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1-14.
- (12) ASHOUR, F. y DEUCHARS, J. (2004) Electron microscopic localization of P2X₄ receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat. *Brain Res.* 1026, 44-55.
- (13) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2002) Colocalisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42, 20-33.
- (14) GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; GUALIX, J. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* 77, 84-93.
- (15) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87, 160-171.
- (16) GIRÁLDEZ, L.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; CASTRO, E. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2001) Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce [Ca²⁺]_i increase in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64, 174-182.
- (17) GU, J. G. y McDERMOTT, A. B. (1997) Activation of ATP-gated P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389, 349-353.
- (18) HUGEL, S. y SCHLICHTER, R. (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 20, 2121-2130.
- (19) KHAKH, B. S. y HENDERSON, G. (1998) ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* 54, 372-378.
- (20) KOIZUMI, S. y INOUE, K. (1997) Inhibition by ATP of calcium oscillations in rat cultured hippocampal neurones. *Brit. J. Pharmacol.* 122, 51-58.
- (21) BENNETT, G. C. y BOARDER, M. R. (2000) The effect of nucleotides and adenosine on stimulus-evoked glutamate release from rat brain cortical slices. *Brit. J. Pharmacol.* 131, 617-623.
- (22) PINTOR, J.; DÍAZ-REY, M. A.; TORRES, M. y MIRAS-PORTUGAL, M. T. (1992) Presence of diadenosine polyphosphates —Ap₄A and Ap₅A— in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.* 136, 141-144.

- (23) DUNKLEY, P. R.; JARVIE, P. E.; HEATH, J. W.; KIDD, G. J. E. y ROSTAS, J. A. P. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on percoll gradients. *Brain Res.* 372, 115-129.
- (24) GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M. y TSIEN, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- (25) Jo, Y.-W. y SCHLICHTER, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 241-245.
- (26) POELCHEN, W.; SIELER, D.; WIRKNER, K. y ILLES, P. (2001) Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience* 102, 493-602.
- (27) BALLERINI, P.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; NARGI, E.; D'ALIMONTE, I.; TRAVERSA, U.; RATHBONE, M. P. y CACIAGLI, F. (2002) Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport* 13, 1789-1792.
- (28) HERLITZE, S.; GARDIA, D. E.; MACKIE, K.; HILLE, B.; SCHEUER, T. y CATTERALL, W. A. (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G protein β, γ subunits. *Nature* 380, 258-262.
- (29) GEREVICH, Z.; BORVENDEG, S. J.; SCHRÖDER, W.; FRANKE, H.; WIRKNER, K.; NÖRENBERG, W.; FÜRST, S.; GILLEN, C. y ILLES, P. (2004) Inhibition of N-Type Voltage-Activated Calcium Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons by P2Y Receptors Is a Possible Mechanism of ADP-Induced Analgesia. *J. Neurosci.* 24, 797-807.

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez



El Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez nació el día 25 de diciembre de 1932 en Alcoy (Alicante). Tomó posesión como Académico de Número el día 17 de octubre de 1985, de la Medalla número 13. Falleció el día 15 de octubre de 2004. La Sesión Necrológica se celebró el día 7 de abril de 2005, participando los Excmos. Señores Académicos Don Guillermo Tena Núñez, Don Juan Jiménez Collado, Don Manuel Domínguez Carmona, Doña Ana M.^a Pascual-Leone Pascual, Doña M.^a Carmen Fráncés Causapé y Doña M.^a Teresa Jiménez Sierra, viuda de Don Domingo Espinós. Fue presidida por el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, quién clausuró el acto con unas sentidas y emotivas palabras.

Perfil humano de Domingo Espinós

GUILLERMO TENA NÚÑEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El Doctor Espinós ofrecía la tranquilidad y la paz necesarias para resolver dificultades y aunque era un hombre de los que más medicina sabía en España, ayudaba a resolver los problemas médicos y los no médicos.

A Domingo le apasionaba el ser humano y quería al hombre, por la pasión cristiana que sentía por la humanidad, siendo de destacar su gran preocupación por los pueblos del tercer mundo.

Domingo Espinós tenía una gran cultura, no sólo médica sino de los temas más variados que se pudieran presentar, especialmente la pintura.

El Doctor Espinós tenía una sensibilidad especial para sus pacientes y así se puede entender como pudo tratar a Dalí como paciente, con las dificultades que presentaba en su trato con los médicos y siendo un enfermo agresivo.

Domingo mantuvo una entrevista con el Papa, que refleja la personalidad que irradiaba el profesor Espinós.

Se comenta la posibilidad de iniciar el proceso de beatificación de Domingo Espinós, ya que según se van conociendo las circunstancias de Domingo, se ve que aparece siempre Jesucristo como centro de su vida y se da uno cuenta que Dios le tenía destinado un lugar especial.

La dedicación a la medicina del Doctor Espinós era absoluta y salvó la vida de muchos enfermos, entre ellos el que escribe este resumen, por lo que agradezco a la Real Academia Nacional de Farmacia el haberme concedido el honor de hablar del Doctor Espinós y de su intachable vida en esta sesión en su recuerdo.

Domingo Espinós, su faceta humana e impronta universitaria

JUAN JIMÉNEZ COLLADO

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina

Excmo. Señor Presidente, Excmo. Señores Académicos, Señoras y Señores:

La Mesa del Instituto de España en su Sesión de fecha 11 de noviembre pasado acordó mi intervención en esta Sección Necrológica como miembro-representante de la misma y de la que el Profesor Espinós fue su Vicepresidente Primero, encargo que asumo como un honor aunque con profunda tristeza por cuanto la amistad labrada desde tiempo y en modo especial e intenso en estos últimos veinte años, me llevó a conocer en profundidad a una persona con una formación y compromiso cristiano ejemplar, pleno de bondad, con especial sensibilidad para darse a los demás con amor y entrega sin reservas, modelos de vida que le hizo ganarse, mirando siempre de frente, el cariño y confianza de los que le rodearon. Alumbró al igual que una llama que para sus amigos y para quienes le conocieron, seguirá siempre brillando en nuestros corazones.

Su trayectoria universitaria fue modélica. Inicia y finaliza sus estudios en la Facultad de Medicina de Valencia, años 1949-55, con un magnífico expediente académico: 26 matrículas de honor y Premio Extraordinario en la Licenciatura, mención esta que conlleva la asistencia a los cursos de verano de la Universidad Internacional Menéndez y Pelayo. A su regreso se incorpora al grupo de jóvenes

que con ejemplar magisterio va estructurando el Profesor Gilsanz, su maestro en la Cátedra de Patología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, en donde va adquiriendo y desarrollando su formación universitaria, primero como Médico Interno por oposición para seguidamente y también por oposición, la plaza de Profesor Adjunto. Para Domingo, la fidelidad a su proyecto fue siempre la respuesta adecuada al compromiso asumido, ya que la interpretó como actitud creativa que contribuye eficazmente en la adquisición de un carácter de autenticidad. Al mantenerse fiel a este ámbito creador, trasladó, impregnó a su personalidad de una peculiar firmeza, validez propia que no son pilares rígidos sino campos de realidad que se edifican y comprometen a través de la actividad creadora. Este deber, asumido y convertido en voz interior, fue su fuente de libertad, con tanta mayor firmeza cuanto más alto fue el compromiso.

La formación universitaria, tan esencial y afortunadamente exigible, fue para él una forma de ser mucho más que de tener; no se reduce a una acumulación de saberes inconexos, sino que es en sí mismo un sistema de valores, una actitud ante la vida. Domingo se forjó en este ideal, supo valorar que lo esencial no es quedarse sólo en las raíces por muy profundas y vigorosas que fueran; salir de la casa propia para buscar e intercambiar enseñanzas es obligado, pues una formación y modelaje endogámico, acaba convirtiéndose en una cómoda e ineficaz actitud en donde la crítica se soslaya y el juicio personal se embota. En una primera etapa se desplaza a Cardiff con el Profesor Gough, después a Edimburgo con los Profesores Davidson y Girwood, y en un segundo periodo con el Profesor Douglas también en Cardiff, después a París con los Profesores Bernard y Mathe y a Londres con el Profesor Dacie, en donde inicia y se consolida en lo que años después será su fundamental línea de investigación, pionera en la Universidad española, orientación hematológica que en esencia suponía una ampliación y no desviación del Internista.

Ya de vuelta en 1971, gana por oposición la Cátedra de Patología Médica de la Facultad de Medicina de Santiago, oposición, sistema para algunos desconocedores o mejor, deseosos de desconocer que gracias a él, la Universidad tuvo la fortuna de escoger y sentar en sus Cátedras a grandes maestros.

Precisamente el día 2 de febrero del pasado año, apenas 70 horas antes de su desgraciado accidente, y como consecuencia de haberme yo retirado de una Comisión —ya no se llaman Tribunales—, en la que estábamos juzgando dos Cátedras por el sistema —peculiar sistema—, de habilitación, comentamos en casa el cambio involutivo sufrido y como aquellas pruebas hoy dolorosamente suplantadas, servían para contrastar el oro puro y diferenciado de falsas y engañosas aleaciones.

En Santiago de Compostela realiza una espléndida labor; no obstante al quedar vacante la Cátedra de Patología Médica de Universidad Complutense por fallecimiento del Profesor Jiménez Díaz, realiza una nueva y brillantísima oposición que gana con plena autoridad, año 1975, Cátedra en la que desarrolla hasta su fallecimiento una labor clínica, asistencial e investigadora extraordinaria, de gran nivel científico con una impronta y personalidad que atrae y compromete a una pléyade de jóvenes profesores con los que revitaliza, crea y orienta nuevos interrogantes, articulándolos siempre bajo su personal y continua dirección.

Porque nadie puede conformarse con seguir las huellas de los que nos precedieron; la vida es un continuo proceso de innovación, la vida hay que hacerla configurando nuevos proyectos, nuevos hechos, nuevas realidades. Domingo fue un buen discípulo de excelentes maestros que pronto se convirtió en maestro para al igual que aquellos que trataron de superar sus fuentes, crean caudal propio: ser maestro de sus discípulos y discípulo de sus discípulos que hoy se sienten orgullosos de su maestro.

Desde la reflexión médica, hoy aceptamos como por ejemplo las bases somáticas del enfermar, no se contemplan solo desde un punto de vista anatomopatológico como ocurría en tiempos de Morgagni, Virchoff o Charcot, o fisiopatológico como lo interpretó Von Bergman, sino que se ha llegado a una visión a nivel biomolecular inspirada por la moderna bioquímica y genética, desarrollándose conceptos como los de errores congénitos del metabolismo. Otro afortunado hecho es la creciente progresión de la especialización y aún de la superespecialización, pero junto con ello, también y siempre la del trabajo en equipo y la aparición y desarrollo de áreas de convergencia entre diferentes especializaciones, que vienen así a fecundar en ellas, sus interrelaciones y eficacia.

Domingo no sólo asume este criterio, sino que lo elabora con minuciosidad, con detalles precisos y estables. Su dogma científico lo basa en definir como buen médico aquel para quien la enfermedad es siempre vida humana; sus trabajos científicos no serán valorables si olvidan que el saber es armonía y que detrás de cada fórmula, de cada cifra, de cada descubrimiento, respira la historia y los hombres en ella.

Fruto de esta dedicación, de este trabajo y de su capacitación para así desarrollarlo, son los éxitos logrados, entre los que más apreciaba y de los que más orgulloso se sentía, era el ser Académico de Número de las Reales Academias Nacionales de Farmacia, en la que ingresó en 1985 y Nacional de Medicina, un año después, en las que siempre intervino y colaboró con vocación, trabajo, total entrega y firme compromiso.

Además, lo puedo y debo decir con pleno conocimiento, Domingo Espinós vivió y disfrutó de la Universidad en toda su profundidad.

Tuvo siempre una actitud bondadosa, virtud que le otorgaba una postura acorde a su vocación y misión, que labró configurando su manera de ser de modo abierto y generoso, creando vínculos estables y comprometidos en el hoy y en el mañana, sabedor a la vez que esta experiencia había que realizarla con vocación de ayuda, de comprender aunque no siempre de justificar, de tender la mano abierta, nunca desde una posición prepotente que no responde y justifica la complejidad que la vida labra en circunstancias determinadas por mil elementos cambiantes.

No vale pasar por este mundo sin dejar una huella de amor y de generosidad; para muchos, mantener la estabilidad por encima de días felices y días tristes, de cumplir fielmente los compromisos contraídos, de vivir intensamente las tareas diarias, es simple rutina. Para Domingo Espinós era finalidad y deber y valor.

Corre el tiempo; en nombre de la Mesa del Instituto de España, de la Real Academia Nacional de Medicina y en el mío propio, manifiesto el más hondo pesar por la irreparable pérdida del Profesor Doctor Don Domingo Espinós Pérez; nos sentimos orgullosos de haber convivido y disfrutado de su presencia, amistad y ejemplo; elevamos al Dios Todopoderoso junto a Mari Tere y sus hijos nuestras oraciones para su eterno descanso.

He dicho.

Domingo Espinós, docente e investigador

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia Doctor Reol Tejada, Excmo. Señor Presidente Honorario Profesor Santos Ruiz, Excma. Secretaria de la Academia Profesora Francés, Excma. Señora María Teresa Jiménez, viuda de Espinós, hijos y nietos del Profesor Espinós, Excmos. e Illmos. Señoras y Señores Académicos, Señoras y Señores.

Inicio mi participación en el homenaje que todos rendimos hoy al Profesor Espinós con un párrafo de gratitud, hacia quienes han hecho posible que presente ante ustedes la figura excepcional del Profesor Espinós. En primer lugar, a la Junta de Gobierno que me confió este encargo a la par honroso y triste ya que debo recordar a la Academia, es decir, volver a pasar por nuestro corazón, a la persona de un gran maestro de la Medicina española, de un extraordinario Académico y un entrañable amigo de todos nosotros. Es muy probable que la Junta haya tenido en cuenta la amistad, que como a todos nosotros, me unía al Profesor Espinós, con el añadido de la amistad familiar con la que me distinguía. En segundo lugar mi gratitud se dirige al propio Profesor Espinós, quién en unión de los Doctores Doadrio López y Portolés, hizo la reglamentaria propuesta en mi favor, para ocupar una vacante de Académico de Número. Yo tengo una gran relación familiar con la Farmacia, un hijo, una cuñada y tres sobrinos farmacéuticos, y había desarrollado la docencia durante diez años, primero en el entrañable Fonseca y luego en la nueva Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela y posterior-

mente formé parte del Claustro de la Facultad Complutense bajo la dirección del Decano Profesor Doadrio durante cuatro años, hasta que la LRU, que tantas buenas cosas no hizo, legal, aunque creo que ilegítimamente, cortó esta tarea vocacional, pero no podía soñar con que algún día llegara a formar parte de esta Real Academia Nacional de Farmacia hasta que Espinos, Doadrio López y Portolés hicieron la propuesta.

Sabía de Domingo por su padre, el Profesor Domingo Espinós Gisbert, que explicaba Anatomía Patológica en la Facultad de Medicina de Valencia, Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Valencia y acreditado médico del prestigioso Cuerpo de Sanidad Nacional, que naturalmente prácticamente ha desaparecido aunque la salud pública se aviene mal con encajonamientos autonómicos; en nuestros encuentros en los Tribunales para Diplomados de Sanidad que dirigía en Valencia me hablaba con legítimo orgullo de su hijo Domingo, cariño y orgullo que Espinós hijo tenía hacia su padre. Ya en Santiago se inició nuestra amistad personal que se extendió a nuestras familias. Deseo reconocer aquí no solo los méritos Académicos de aquella Universidad, sino el clima que propiciaba la irradiación de amistad de los que nos incorporábamos a ella. Muy pronto ganó por brillante oposición en competencia con magníficos Catedráticos, la Cátedra que había regido el Profesor Jiménez Díaz. En Madrid continuó nuestra amistad consolidada con nuestras reuniones familiares y en las Reales Academias a las que pertenecía; sin embargo lo apretado de la agenda cotidiana de Domingo nos acortaba mucho el tiempo del que podíamos disponer. Antes los hombres se relacionaban en las ágoras, en los casinos y las tabernas y en el XVII y XVIII en la afrancesada Europa en los cenáculos y en los mentideros. En el XIX y hasta la Guerra Civil había tertulias, recordemos a Cajal, en donde los amigos, los compañeros intercambian saberes, conocimientos y sentimientos. Hoy el mundo de la comunicación nos proporciona conocimientos en exceso pero sin comunicación intelectual y afectiva que yo conseguía a menudo en el BMW del Profesor Espinós cuando le acompañaba para poder gozar de su compañía y de su conversación al terminar nuestras sesiones de los jueves en el breve trayecto de la Academias al Corte Inglés, en donde nos despedíamos. Por esa amistad que Domingo me otorgaba mi reconocimiento y gratitud. Esas conversaciones se en-

riquecían con algunas cenas familiares, en unión de alguno de los múltiples amigos del matrimonio Espinós, en las que compartíamos con nuestras mujeres nuestras ideas y nuestras ilusiones.

Es muy difícil solidificar en palabras la esencia de una persona. Domingo era médico; la Medicina, como la Farmacia, no es una ciencia; ambas son más que ciencia, pues utilizan esta para sus fines que básicamente son prevenir, curar y siempre ayudar al hombre. Trataba enfermos, es decir, personas dolientes, a los que se entregaba de forma total, lo que es mucho más difícil que tratar enfermedades; una cosa es bajar la tensión arterial de un hipertenso y otra mucho más importante, tratar a un hipertenso y Espinós conseguía lo uno y lo otro; yo que apenas he ejercido la clínica me he sentido siempre admirado de los que como Espinós tenían el don del sentido clínico y me he preguntado si era genético o adquirido por el trabajo y el estudio. El Profesor Espinós irradiaba confianza. La confianza es una virtud que acompaña a la amistad y a la vida social, pero que adquiere mayor trascendencia en el caso de Domingo pues el quehacer médico es lo que Marañón definió como una confianza en búsqueda de una conciencia. Espinós tenía ambas y de ello nos hemos aprovechado casi todos nosotros, haciendo cargar a Domingo con la responsabilidad de atender a nuestros problemas de salud, y solicitando su opinión respecto a múltiples asuntos en los que Espinós aclaraba nuestra postura. Trabajador incansable, sabía escuchar sin prisas, veía al enfermo como hombre no dejando que se interpusiera la técnica en este trascendental diálogo del médico con su paciente.

Domingo fue el médico de Mercedes, de mi mujer, a la que atendió silenciosa y solícitamente; nunca olvidaré la sonrisa que iluminaba la doliente cara de mi mujer, consciente de lo irremisible de su enfermedad, cuando Domingo la visitaba, sonrisa que sólo apareció cuando le comunicó mi hijo el embarazo de su primer nieto y cuando la visitaba Domingo. Pero a que viene a insistir, en esto si la gran mayoría de nosotros tenemos esa deuda de gratitud para el Doctor Espinós, al cual hay que reconocerlo con sentimiento de culpa, lo hemos sobrecargado, con nuestras consultas, no sólo médicas sino referentes a todo lo que requería su buen consejo. Con Espinós la Academia y los Académicos hemos perdido a nuestro médico de cabecera.

Domingo ha disfrutado en su vida de dos tesoros; la familia de la que procedía y la que él formó con María Teresa de quien se mostraba admirador y enamorado.

Nosotros los Académicos, hemos sin duda alguna trabajado, estudiado y luchado, es decir, resistido, pero que hubiéramos sido muchos de nosotros sin la presencia en nuestras vidas constante protectora y cariñosa, de nuestras mujeres o en el caso de nuestras queridas Académicas de sus respectivos maridos.

Deseo destacar la libertad con la que el Profesor Espinós desarrolló la aventura de su vida y con la que obtuvo sus merecidos éxitos. La libertad personal apoyada en la razón, nos libera de las ataduras de nuestro yo, haciéndonos independientes respecto a nuestras propias inclinaciones, deseos, impulsos y hasta tentaciones, liberándonos así del fácil determinismo de la naturaleza humana, pero también resistiendo a las fuertes presiones de todo tipo que Espinós pudo superar gracias a su rectitud y a su alto valor moral.

En la biografía de un hombre no se puede hurtar la muerte, esta inseparable compañera que nos desgarrá cruelmente al separarnos de los que amamos, pero esa misma cruel muerte hace digna la vida del hombre. Hoy sabemos que la resurrección es completa, que lo permanente del ser humano no es un ectoplasma, un ser fantasmal o un alma platónica, sino un hombre completo y quiero creer con sus necesidades (Jesucristo resucitado comió con sus discípulos). Domingo, como escribió Luis Vives, «murió sabiendo cuándo se puede encontrar la paz, la frágil paz de este mundo seguro de hallar en el otro la que no se acaba». Durante su enfermedad he sentido tras su mirada cariñosa, serena, penetrante, algo irónica, propia del que ya está por encima de nosotros, un mundo de confidencias y de sentimientos.

El encargo que me confió la Junta de Gobierno se concreta en glosar la faceta investigadora y docente del Doctor Espinós, importante actividad, pero mucho me hubiera gustado hablar de su insoportable conducta, de su inteligencia, constancia y laboriosidad que le hacía trabajar asiduamente, sin descanso, y sobre todo de su bondad, «antes que el tiempo muriera en nuestras manos», como dice la Epístola Moral. Igualmente debería destacar su defensa numantina de lo que consideraba que debían ser las Cátedras de Medicina Interna, la del carácter universitario de los Hospitales Clínicos, del

prestigio de los profesores universitarios, deteriorado por los que desean, como buitres, nutrirse con sus restos o la defensa de su idea de España, no coincidente con muchas de las que ramplonamente se nos presentan a diario, o de su entrega constante a su familia y, por último, del enraizamiento de Dios en su vida. Todo esto no es docencia, nada de esto es investigación, pero tanto una como otra se basan en aquellos modos de ser y de hacer.

Espinós investigador

La Ciencia es la búsqueda, el servicio apasionado a la verdad y, para ser más justo, de la verdad científica, la «diakonía de la verdad» de los griegos, y aunque Heidegger consideró en «Sein un Zeit» que la verdad era un robo, para mí es el trasunto de la realidad, que como el aceite sale a la superficie. La Ciencia se hace mediante la observación de los fenómenos que se nos presentan espontáneamente o provocándolos mediante la experimentación; no cabe duda que Espinós hizo Ciencia y como médico nada humano le era ajeno. El ámbito científico del Profesor Espinós era la enfermedad que, como dijo Claude Bernard, «es un experimento no provocado que la naturaleza humana trae a nuestra consideración por azar en un momento dado». Así la veía Espinós como científico, observando atentamente al enfermo que atendía utilizando todas las disponibilidades que la tecnología ofrece a la Medicina, pero sin olvidar, como hacen demasiados médicos, la relación personal, de confianza acompañada de conciencia, observando atentamente al enfermo. Espinós con la anamnesis, la inspección, la palpación, la percusión y la auscultación; con ellos obtenía el Doctor Espinós más datos de sus enfermos que los que sólo fiaban sus juicios clínicos a los informes de técnicos, que desde luego no desdeñaba.

No he de desgranar y analizar la multitud de sus trabajos y publicaciones, más de 400, las cuales, lo reconozco, han sido una rica cantera, en la que he recogido valioso material para mis trabajos y conferencias. Su tesis leída en Madrid en 1963 bajo el título «La deficiencia de la vitamina B12 y del ácido fólico en la clínica: su diagnóstico por dosificación *in vivo*», recibió el premio extraordinario. Espigo entre sus numerosos estudios, los publicados con el profesor Álvarez Sala sobre el 2,3- difosfoglicerato que modifica la afi-

nidad de la hemoglobina para el oxígeno respuesta en la hipoxia o los efectuados sobre la apnea obstructiva del sueño. Muy importante ha sido la investigación epidemiológica como la que efectuó con la Profesora Ana Villegas sobre las talasemias, y el trabajo con el Doctor Horacio Rico, sobre la masa ósea de los españoles. De gran interés han sido sus estudios sobre la coagulación intravascular diseminada en unión con la Doctora Amalia Escrivá o con el Doctor Elpidio Calvo, hijo del Profesor Felipe Calvo, distinguido Académico de esta casa. La osteoporosis ha sido también un campo en donde trabajó intensamente el Profesor Espinós; recordemos su colaboración en la monografía de la Doctora Cascales de esta casa y el descubrimiento de gran trascendencia clínica de que a las cuatro horas de la toma de calcitonina debe administrarse calcio para suprimir el bache hipocalcémico que la calcitonina produce. Un tema sobre el que estaba especialmente interesado era la inflamación de la que se ocupó en el magistral discurso en la apertura del Curso Académico de 1999, en interesantes trabajos publicados con los profesores Calvo y López Buenadicha que culminaron con el capítulo dedicado a las bases farmacológicas de la inflamación de la Monografía XV, dirigida por los Profesores Avendaño y Tamargo. Magníficos sus trabajos sobre la célula endotelial que en manos de Espinós dejó de ser una membrana limitante entre la sangre y la pared vascular a tener una importancia central en la fisiología y en la patología, especialmente en la de la hipertensión. Del conjunto de trabajos del equipo del Profesor Espinós salieron 53 tesis doctorales dirigidas personalmente por el profesor Espinós y otras muchas por sus colaboradores. Domingo tuvo la suerte de contar para la redacción de sus publicaciones de la colaboración de Margarita, su mano derecha, en la redacción de sus trabajos.

Ante el despliegue de su vasta obra nos podemos preguntar por qué razón eligió Espinós estos temas aparentemente tan dispersos; razones de oportunidad, de azar; no lo sé, pero me gusta pensar que una motivación importante debió ser que en todos ellos late su vocación de atender a la persona, recordemos nuevamente a la inflamación, la célula endotelial, la hematología, especialidad médica de la que fue, como señaló el profesor Díaz Rubio en una nota necrológica, publicada en Diario Médico «alma de internista, hematólogo de referencia», es decir, los temas que más relación tienen con la unidad irreplicable

del ser humano en la importante situación vital de la enfermedad. El sujeto de los trabajos de investigación de Espinós ha sido el enfermo, ese prójimo que se ha hecho doliente y que forma parte de la realidad y por consiguiente de la verdad. El Profesor Espinós amaba al Hospital Clínico de San Carlos del que fue Director y esclavo; gracias al entusiasmo del Profesor Espinós se crearon en él los Servicios de Patología Ósea y de Patología Respiratoria y sobre todo, el de Hematología, que aumentaron el prestigio de dicho Hospital. Debo resaltar que la nueva hemoglobina, causante de talasemia, descubierta por el equipo del Doctor Espinós, especialmente por la Profesora Villegas, tiene el nombre «Hb Clínico-Madrid».

Espinós docente

El Profesor Espinós era un docente vocacional. Por su preparación pudo haber dedicado sus cualidades a otras muy diversas actividades. Tenía ganadas nueve oposiciones, pero su vocación docente le llevaba a la Universidad, para lo cual se preparó a fondo en el pregrado y posteriormente en los puestos de Médico Interno y de Profesor Adjunto de Patología y Clínica Médicas ganados por oposición, formándose al lado de su maestro, el profesor Vicente Gil Sanz, a quien profesaba una ejemplar devoción, y con los profesores Gough de Cardiff Girdwood y Stanley Davidson y Ronald Girwood de Edimburgo, de Stuart Douglas de Glasgow, Jean Bernard y George Mathé de París y con el profesor Dacie de Londres, es decir, con las autoridades científicas más importantes de la época. Catedrático, muy joven en 1971, de la Facultad de Medicina de Santiago de Compostela y a partir de 1975 de la Complutense de Madrid, ocupando tras memorables oposiciones, la Cátedra que había ocupado el profesor Jiménez Díaz, dos señeras instituciones de la Universidad Española, pues aún cuando tenían sus sedes en diferentes ciudades, su caudal humano era común, sus profesores tenían la misma procedencia, los mismos modos de formación y de promoción y sobre todo su contribución a la sociedad era universal como corresponde a la Universidad que se honra en ser universal; nada más que comentar. Cada clase del Profesor Espinós era una conferencia en la que destacaba lo que enseñaba y cómo lo enseñaba, pues la docencia se justifica por lo que aprenden los alumnos y por el entusiasmo que el maestro

les ha suscitado, pues con Goethe, «el hombre aprende sólo aquello que ama», y por eso Espinós hacía partícipes a sus discípulos de la verdad que él exponía con claridad y convicción, apoyado en la voluntad de su espíritu. El Profesor Espinós era sencillo, asequible, dialogante, como suelen ser los hombres de ciencia, lo que atestiguan sus alumnos que en varias ocasiones le nombraron padrino de sus respectivas promociones. Era una delicia escucharle viendo cómo desplegaba su concepto del tema explicado, liberándolo, limpiándolo de la maraña de datos que impedían ver el árbol. En la Universidad compostelana intentamos coordinar las temas de Patología Médica con los de Medicina Preventiva, explicando para cada problema de salud los aspectos clínico y preventivo, con mediano resultado por la asimetría que el contenido docente de cada tema presentaba en nuestras disciplinas. La docencia también se puede ejercer con los que no se establecieron, por diversas razones, una relación personal. En esta tarea también Espinós ha cumplido como bueno y así disponemos hoy del monumental «Tratado de Medicina Interna» que editó con su gran amigo el profesor Manuel Díaz Rubio al que añadiré la serie de las «Clínicas Médicas de España».

La máxima docencia es la que se ejerce sobre los discípulos siguiendo el juramento hipocrático: «enseñaré a mis hijos, a los de mis maestros y a los que se me unan en virtud de juramento». Son discípulos, los que así se llaman, los que en realidad nos hacen maestros, los que captan además de conocimientos, actitudes y conductas, pero el maestro Espinós no sólo enseñaba a sus discípulos, los respetaba y quería y aprendía de ellos. Los discípulos del Profesor Espinós son muchos y todos ellos de una gran categoría científica y personal; he sido confidente del cuidado y cariño que Espinós puso en cada uno de ellos; muchos de los cuales han alcanzado la dignidad de catedrático y con la preocupación de olvidar a algunos, debo señalar a José Luis Álvarez-Sala Walter, Carlos Lozano Tonkín, Ana Villegas Martínez, Horacio Rico Lenza, Jesús Millán Núñez-Cortes, y otros que lo serán o que al menos lo merecen como el citado Profesor Elpidio Calvo Manuel, Joaquín Díaz Mediavilla, hijo de un querido amigo, Escribá, Aboín, etc., sin olvidar a los que vocacionó Espinós durante su docencia en Santiago de Compostela, los Doctores Zúñiga y Torre Carballada. Por todo ello no puede sorprender el éxito que tuvo el homenaje que le dedicamos en el Casino de Madrid.

Epílogo

He dicho que el hombre de ciencia busca la verdad. La verdad de Domingo ha sido pasar haciendo el bien y en ello estribaba su felicidad. Domingo ha sido un hombre feliz. Los sanitarios empleamos marcadores para cuantificar fenómenos no accesibles directamente; si utilizamos como un marcador del bien, que cada hombre ha hecho, los amigos que tiene, el número de los que lo han sido de Espinós son legión; revisemos por ejemplo: ¿Quién en esta casa no era amigo del Doctor Espinós? Todos nosotros, académicos y no académicos. Una parte de sus amigos abarrotó el Casino de Madrid en no muy lejano homenaje a su figura, y una multitud colmó el enorme recinto de la Catedral de la Almudena con ocasión de su funeral, pero seguro que fueron aún muchos más los que rezaron por él.

He perdido, hemos perdido todos, a un amigo, a un compañero de quien aprendíamos y en quien nos apoyábamos, un hombre que formó una familia en la que depositó su cariño, un hombre que buscaba para sacar del fondo la verdad y la esperanza, un hombre quien constantemente tejía con delicadeza el cañamazo de la fraternidad; un hombre que era médico y más meritoriamente y raro que ejercía como tal; quien a su ciencia unía caridad: quien a Dios adoraba y a quien Dios quería y quiere. Un hombre indivisible, el Profesor Espinós Pérez, para quien la muerte era el umbral de la vida eterna; cruzó la puerta tras la cual se escondía todo lo que él buscaba.

Por último expreso en nombre de la Real Academia y en el mío propio, nuestro emocionado recuerdo y el más hondo pesar por la temporal ausencia de tan ilustre Académico, que tanto hizo por el prestigio de esta Institución especialmente ante su mujer, María Teresa, a sus hijos Domingo, María, Teresa, Miguel, Juan y Jaime, a sus nietos y, permitidme que destaque a sus gemelitas, a sus hermanos, a toda su gran y magnífica familia, así como a sus compañeros, discípulos y amigos. La medalla número 13 que ostentaba el Profesor Espinós está cargada ahora con el afecto y la gratitud de todos nosotros. ¡Que Dios nos guarde, Domingo contigo!

He dicho.

Espinós Académico

ANA M.^a PASCUAL-LEONE PASCUAL

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

En primer lugar, quiero agradecer al Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y a la Junta de Gobierno el haberme invitado a intervenir en esta Sesión Necrológica dedicada al Doctor Espinós. Para mí es un honor poder hablar del Profesor Espinós como Académico, a la vez que siento una gran tristeza por su ausencia. Creo muy sinceramente que todos los Académicos hemos perdido a alguien muy valioso como acaban de escuchar en las intervenciones precedentes.

Yo conocí al Doctor Espinós precisamente como Académico, cuando entré el 7 de noviembre de 1996 como Correspondiente y comencé a colaborar con la Academia. Sus intervenciones en las sesiones eran modélicas siempre, coherentes, inteligentes y amables. Al poco tiempo, yo había descubierto una personalidad muy valiosa y alguien de referencia en la Academia. Cuando presenté mi candidatura para Académico de Número fue, quizá, la primera vez que hablé con él directamente. Me habló enseguida de mis hermanos, que habían sido compañeros suyos en la Facultad de Medicina de Valencia, de su origen valenciano y me sentí cómoda, porque él aclaraba las situaciones e irradiaba sinceridad y cordialidad.

Sus intervenciones en la Academia eran siempre oportunas, desde su posición clínica y desde el punto de vista estrictamente fisiológico, hablaba para aclarar puntos, para enriquecer, para dialogar, en ese sentido era un verdadero académico que aporta riqueza intelectual, lo cual creo que es el aporte más valioso para esta Institu-

ción. Además, lo hacía con generosidad, sin miras personales y con mucha inteligencia. El Instituto de España tuvo un gran acierto al nombrarle Vicepresidente 2.º, y lo mismo la Real Academia de Medicina, haciéndole Vicepresidente el año 2002.

Sin embargo, yo nunca tuve tiempo de indagar cómo se había gestado una tan rica personalidad, y es ahora en la preparación de esta intervención, por la amabilidad de la Doctora Francés al permitirme el acceso a su curriculum y a su discurso de entrada a esta Academia, cuando he comprendido en profundidad que el Doctor Espinós fue coherente en su formación desde el principio. Ahora comprendo por qué uno se sentía siempre ante un médico cuando hablaba con él y comprendido en profundidad cuando exponía temas científicos básicos de biomedicina que redundaban en determinadas patologías, aunque no fueran intereses específicos del Doctor Espinós. Yo conozco bien el ambiente médico, soy de una familia de sanitarios a partes iguales entre médicos y farmacéuticos, o quizá con más porción médica y, sobre todo, he desarrollado toda mi carrera como investigador en el área de biomedicina, además procedo de Valencia. Todo ello hizo que desde un principio, y en poco tiempo, hubiera un puente de comprensión científica entre nosotros. El Profesor Espinós era hijo del Doctor Espinós Gisbert, Médico de Sanidad y Anatomopatólogo, nieto de médico, y también su mujer, M.^a Teresa, es médico, como señala, en primer lugar, el Doctor Espinós en su curriculum, y ese ambiente, como su procedencia levantina, a floraban siempre en él. Como saben, nació en Alcoy el día de Navidad de 1932. Todos los Profesores de la Facultad de Medicina de Valencia, a quienes nombra en sus entrevistas y curriculum, fueron conocidos por mí, ya que hice la Tesis Doctoral en dicha Facultad a finales de los años cincuenta, coincidiendo con los tiempos finales de su carrera, aunque nunca nos conocimos allí. Conozco, pues, el medio, la época y la pobre infraestructura de la Facultad en aquellos tiempos en los cuales comenzó su formación. Por ello, yo quisiera hoy destacar ante ustedes y mostrarles, de alguna manera, cómo se gestó y cómo llegó él a lograr la formación de la personalidad valiosa que les acaban de exponer y que le han hecho ser tan apreciado, creo que unánimemente por todos nosotros, como gran Académico de esta Institución.

La lectura de su curriculum, redactado en primera persona, y con comentarios propios, es un diálogo con él y es una manifestación

viva de su personalidad. El Doctor Espinós nos cuenta su vida profesional con exactitud, sin jactancia, con rigurosidad y, sobre todo, con enorme sinceridad. Es un recorrido por su vida profesional lleno de agradecimientos por doquier; a los profesores nacionales que le formaron en la Facultad de Valencia o a sus maestros internacionales y a todas las gentes y discípulos que le ayudaron. Entre su curriculum con comentarios y sus entrevistas en periódicos, con motivo de sus últimos nombramientos, podemos saber lo que pensaba de cuestiones acerca de la formación médica e incluso de cuestiones sociales, por tanto podemos tratar ahora de dialogar con él, de comunicarles a ustedes lo que dijo y pensaba.

En su curriculum relata una vida de enorme trabajo personal desde sus comienzos. En una entrevista a la revista «Medicina», el 23 de julio de 2002, dice Espinós: «*En Medicina hay que estudiar cinco horas diarias desde el primer día de clase y, el fin de semana, sacar 12 horas desde la tarde del viernes*», y él lo hizo, como creo que hay que hacer en la Universidad, en cualquier carrera, para adquirir una verdadera formación, aunque a mucha gente le cueste creerlo, y sobre todo hacerlo.

También nos cuenta cuando llegó a Madrid hacia 1956, en la misma entrevista: «*Hay quien va teledirigido. Yo no, pero me busqué un hueco. Empecé por recorrerme servicios. Entonces había pocos hospitales*». De tal forma lo hizo que esa búsqueda le permitió elegir como maestro y mentor en Madrid al Doctor Don Vicente Gilsanz, después de contactar con Enríquez de Salamanca, Marañón y Jiménez Díaz. El Doctor Espinós nos dice: «*me impactó su faceta clínica. Yo me ponía de oyente en sus sesiones y le escuchaba desde el fondo*».

Por encima de sus oposiciones ganadas: desde alumno interno de anatomía (Valencia) en 1951, hasta en 1975, Catedrático de Patología y Clínica Médica (Complutense, Madrid). O sus Premios: desde el Peregrín Casanova (de Anatomía) por oposición en Valencia en 1951 hasta el «Fellow» del Royal College of Physicians de Edimburgo en 1978. O por encima de sus becas, que le permitieron su formación postdoctoral, lo que destaca en su curriculum, como veremos, es, además de su enorme capacidad de trabajo, su acertado criterio dirigiendo su propia formación, y un sentido práctico que le lleva siempre a aprovechar lo aprendido y aplicarlo. Cuando gana la

plaza de alumno interno de la Cátedra de Histología y Anatomía Patológica, nos dice Espinós: «*Esto me permitió durante los cuatro últimos cursos iniciarme en el examen microscópico de las piezas de autopsias y de las biopsias clínicas, adquiriendo así una amplia experiencia en el conocimiento del sustrato morfológico de las enfermedades, así como en la tecnología del laboratorio histomorfológico*», y esa sólida formación anatómica le hace afirmar en la entrevista del 2002 en la revista *Medicina*, refiriéndose a su etapa madrileña con el Doctor Gilsanz: «*cuando llegué ya había aprendido mucho de la anatomía patológica, que es la conciencia de la Medicina. Es algo que los médicos más jóvenes no entienden*». En su etapa de estudiante, esa formación anatómica la compatibiliza con sus funciones de interno del equipo asistencial del Hospital Clínico de Valencia, cátedra del Profesor Miguel Carmena, y en los últimos años de carrera fue Jefe de Prácticas de Histología y Anatomía Patológica, cosa que, dice, le sirvió como inicio en la docencia. Recién acabada la carrera, en 1955, y para completar su formación histopatológica, sigue un curso de Histopatología del Sistema Nervioso con el Profesor Julián Sanz.

En 1956 viene a Madrid y entra con una pequeña beca en urgencias con el Profesor Gilsanz. Dice el Doctor Espinós refiriéndose a Gilsanz: «*bajo cuya dirección y enseñanza se irá desarrollando mi formación clínica, docente, investigadora y humana*». Su preparación en morfopatología hicieron que en dicho laboratorio, «*sentara las bases de valoración en la patología y examen microscópico de la biopsia renal*».

Su primera beca para el extranjero fue por oposición de la Diputación Valenciana, para Cardiff, con el Profesor Gough, sobre «*Estudio funcional de las bronconeumopatías crónicas*». Lo que, según nos dice el Doctor Espinós, le sirvió en Santiago para impulsar desde su cátedra un Laboratorio de Exploración Funcional Respiratoria.

Posteriormente, desde Madrid, la Fundación Stevenson del British Council le concedió una beca para Edimburgo con los Profesores Stanley Davidson y Ronald H. Girdwood. El Doctor Espinós dice del primero, Davidson, que era un gran internista y un experto en anemias carenciales. Aprendió cateterismos cardiacos, pero vio, nos dice, que había una unidad allí de hematología «*fenomenal*» y eso le interesaba más y, también la hemostasia; para aprenderla compati-

bilizó su estancia en Edimburgo por las mañanas, con viajes a Glasgow por las tardes a aprender hemostasia. Así, nos dice: *«aprendí cateterismo, lo que me permitió estudiar el mecanismo del shock en el infarto de miocardio»*; dicho estudio lo presentó para su entrada en la Real Academia de Medicina de Valencia. Tanto en Edimburgo como en Glasgow se inició en el estudio de enfermedades de la sangre, *«me apasioné por la hematología»*, nos dice.

Por último, en el año 60, con una beca de la Fundación Juan March, estuvo cuatro meses en Edimburgo trabajando con el Profesor Girowood sobre Valoración de vitamina B-12 y ácido fólico, cuyo trabajo constituyó en Madrid su Tesis Doctoral, realizada en el CSIC, en el Instituto de Medicina Experimental que dirigía Enríquez de Salamanca. También en Edimburgo, fue nombrado Clinical Assistant in Cardiology después de haber, por primera vez en Gran Bretaña, puesto a punto la determinación del «Volumen minuto con yodo radioactivo».

De sus estancias en el extranjero y de sus etapas de formación, comenta el Doctor Espinós en una entrevista de 2002: *«Cuando yo veía una cosa en mi trayectoria que me parecía interesante y lo podía hacer, lo hacía. Y si me encontraba con un obstáculo procuraba superarlo»*.

En su etapa de Profesor Adjunto en Madrid profundizó más en la Investigación clínica de enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos, dice, y creó el Laboratorio Clínico y de Investigación Hematológica en el seno de la cátedra de Gilsanz, que luego se transformó bajo su dirección en el Laboratorio de Hematología del Hospital Clínico, a la vuelta de Santiago. Durante esta época se desplaza a París y trabaja con Jean Bernard para familiarizarse con técnicas de hemoblastosis. Y también durante cuatro meses, en 1969, al Royal Postgraduate de Londres, en el Servicio de Enfermedades de la Sangre, adquiere experiencia, según nos cuenta, en Unidades Abióticas, unidades que posteriormente monta en el Hospital Clínico, del cual fue director desde 1976-78. Todas sus etapas están reflejadas, como ustedes imaginan, con publicaciones sobre los distintos temas estudiados.

De su estancia de catedrático en Santiago, nos enumera y concreta que, habiendo encontrado los laboratorios desmantelados, consi-

guió crear al final una Unidad de Exploración de Enfermedades de la Sangre y un Estudio de Enfermedades Respiratorias, además de un Servicio de Endoscopia, que siguen funcionando en Santiago de Compostela. Y de su etapa de catedrático en Madrid desde 1975, marca dos líneas de investigación: Estudio de las Enfermedades de la Sangre y Órganos Hematopoyéticos, y otra: Estudio de la Patología del Hueso, tan coherentemente relacionada con la primera.

El Profesor Don Manuel Díaz Rubio, a su muerte, publicó un conciso y magnífico artículo cuyo título reza «In memoriam: Alma de internista y hematólogo de referencia. Las metas cumplidas de Domingo Espinós», que, como ven ustedes, después de lo expuesto, no puede ser un título más expresivo, sintético y real de su personalidad profesional. En este artículo resume su labor y las notas y cualidades de su carácter. Entre muchas otras cosas le califica de luchador hasta el final, y desde el principio, podemos añadir, como ustedes han visto.

A pesar de sus muchas ocupaciones clínicas, desde su entrada como Académico de Número en esta Institución, tuvo tiempo para ser, en 1987, Vicepresidente de la Sección 4.^a Higiene y Sanidad, a la que pertenecía, acompañar en su entrada al Doctor Don Julio Rodríguez Villanueva y al Doctor Don Vicente Vilas en 1986, y en 1989 contestar en su entrada como Académico al Doctor Domínguez Carmona, leer el Discurso Inaugural en esta Academia en 1999 y ser en 2003 Miembro del Consejo Editorial de los Anales.

El 17 de octubre de 1985 leyó su discurso de entrada como Académico de Número de esta Corporación titulado: «Importancia del conocimiento de la Carcinogénesis Química en la Prevención del Cáncer», aunque por razones de tiempo no podamos entrar a fondo en su contenido, les diré que resalta los factores ambientales, por encima, quizá, de los genéticos, en la etiología cancerosa, y es, como cabía esperar, una rigurosa y completa exposición sobre el tema. Por sus muchas ocupaciones, tuvo que pedir, para prepararlo, un año de prórroga. Ocupó la medalla número 13 que había cubierto Don Francisco Bellot Rodríguez, Catedrático de Fitografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Complutense; firmaron su propuesta los Profesores García de Jalón, Don Antonio Doadrio y el Profesor Calvo, y contestó a su discurso el Doctor Don Alfredo Carrato Ibáñez.

Antes de terminar quisiera leer unas palabras dedicadas a su mujer y a sus seis hijos, que una vez más transcribo, porque muestran, además, su pensamiento en aspectos sociales, los cuales no ha dado tiempo de glosar en esta intervención. Preguntado si su mujer M.^a Teresa, médico que él conoció en el laboratorio del Doctor Gil-sanz, dejó de trabajar al tener hijos contesta: *«Dejo de hacerlo cuando tuvo a nuestros hijos, y creo que eso la frustró, pero cuando ya estaban criados se hizo especialista de medicina del trabajo y ahora ejerce como tal. Lo decidió ella y yo actué como el típico varón, porque creo que es fundamental que en los primeros años de vida del niño la madre esté en casa. Y creo que el Gobierno debería dar a las mujeres un sueldo por ello»*. M.^a Teresa, personalmente, creo que hiciste una gran elección y que con tus hijos podéis estar muy orgullosos de él, que seguro ha alcanzado la Gloria de los Bienaventurados, y aquí tenéis todos una Academia agradecida a la presencia de Don Domingo Espinós en ella.

Y ahora, para finalizar, quisiera leer un párrafo que muestra otra faceta de su personalidad: la elegancia, y, además, su sentimiento hacia esta Academia, corresponde a los agradecimientos en su discurso de entrada:

«He hablado de agradecimientos, pero también de satisfacción, porque me satisface y engrandece formar parte de la Real Academia de Farmacia y poder sentarme entre ilustres Científicos. Satisfacción también porque para un Médico Internista es muy importante integrarse en ella. Desde el campo de la Medicina, y más concretamente de la Medicina Interna, se ve a la Ciencia Farmacéutica como la base de la culminación del acto médico, es decir, como la base científica del tratamiento. Sin éste, aquél —el acto médico— no tendría sentido ni razón de ser, porque la empresa común entre un hombre que sufre y busca ayuda —el enfermo— y otro hombre que está preparado y dispuesto a dárselo —el médico— termina siempre en el tratamiento. Esto es lo que da sentido al acto médico. Por esto siento una particular satisfacción como internista por entrar como Miembro Activo en esta Real Academia de Farmacia».

He dicho.

Necrológica del Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez

MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Mi intervención se une a las manifestaciones de dolor que ha supuesto la pérdida de nuestro amigo y compañero, el Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez, y que emocionadamente se expusieron en la sesión necrológica que tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Medicina el 1 de febrero de este año y en la sesión que hoy se ha realizado en nuestra Corporación.

El Doctor Espinós era el prototipo de bondad, generosidad y caballerosidad, no exento de un fino humor con el que contemplaba las acciones humanas y, con su espíritu de moderación, opinaba sobre ellas.

Los Académicos de nuestra Corporación disfrutamos de su saber para nuestro bienestar, pues no sólo nos visitaba cuando estábamos enfermos, sino que intercambiaba opiniones con los médicos que nos trataban y que le veneraban, pues casi todos ellos habían sido alumnos suyos. Además nos daba consejos personales para mejorar nuestras condiciones físicas, consejos a los que él, con la humildad que le caracterizaba, no daba importancia, pues afirmaba que eran «remedios caseros»; pero lo cierto es que con ellos nos infundía ánimos para vencer la enfermedad y la situación en que nuestra salud se hallaba comprometida. Se puede decir que el Doctor Espinós era «el médico de los Académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia».

Nunca podré olvidar cómo se ocupó de mí tras ser operada de apendicitis el 24 de diciembre del año 2001, ni su apacible sonrisa, ni su trato sencillo, dulce, elegante y exquisito, modelo de cortesía académica. Por todo ello, quedará siempre en mi memoria el recuerdo grato y afectuoso del Doctor Domingo Espinós. Gracias, Domingo, por tu «excelencia» y tu bondad. Para ti María Teresa y para todos sus deudos, mi sentimiento por su pérdida en la confianza de que se encontrará en la paz del Señor.

Muchas gracias.

Domingo Espinós, un hombre entregado a los demás

EXCMA. SEÑORA DOÑA MARÍA TERESA JIMÉNEZ SIERRA
Viuda de Don Domingo Espinós

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Señor Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Ciencias, Excmo. Señor Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmos. Señores Presidentes Honorarios de las Reales Academias Nacionales de Farmacia y de Medicina, Don Ángel Santos y Don Hipólito Durán, Excma. Señora Secretaria de la Real Academia de Farmacia, Excmos. Señoras y Señores Académicos, queridos amigos:

Quisiera en primer lugar, dar las gracias a la Real Academia de Farmacia, por organizar este acto en recuerdo a Domingo, en un lugar donde él tanto disfrutó con la presencia y las actuaciones de sus compañeros académicos. Fue la academia de Farmacia, la primera a la que perteneció Domingo, puedo asegurar que le hizo una gran ilusión y siempre se sintió muy orgulloso de pertenecer a ella. Últimamente me repetía muchas veces: «estos académicos de Farmacia son muy activos y tienen una gran inquietud científica». Y lo decía con mucha satisfacción. Doy también las gracias a los señores Académicos que han intervenido en este acto, por lo bien que han reflejado la figura de Domingo y sobre todo por el cariño con que lo han hecho. Gracias también al Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Farmacia por permitirme intervenir en este acto y gracias, finalmente, a todos los que estáis aquí por vuestra presencia. Quiero mucho a Domingo y no me quedaba tranquila sin apor-

tar mi granito de arena a su recuerdo, después de haber estado más de cuarenta años junto a él. Pido perdón a todos por este atrevimiento, pero prometo que seré breve.

Domingo, a mi parecer, fue un hombre fundamentalmente bueno, aunque tenía otras muchas cualidades que le habían sido dadas y que él se encargó de mejorar a lo largo del tiempo, porque tenía un gran afán de superación y espíritu de sacrificio. Fue también un hombre independiente, porque quiso serlo, y las decisiones que tuvo que tomar en su vida, a veces difíciles, las tomó basándose en el conocimiento que tenía de los asuntos a tratar y en sus principios morales, que eran muy sólidos y muy auténticos. Lo hizo siempre con gran honestidad. Comentaba a veces que el ser independiente era muy caro, pero nunca le importó.

Fue un gran profesional, tenía una vocación muy clara y se entregó a ella con todas sus fuerzas.

Fue un gran médico, sabía mucha medicina porque dedicaba mucho tiempo a su estudio y sabía aplicar sus conocimientos, pero sobre todo consideraba a los enfermos como algo muy suyo y cuando un caso era grave o complicado, lo tenía siempre en su pensamiento. Le he visto con las maletas cargadas en el coche renunciar a sus vacaciones, porque alguien pedía su ayuda en ese momento y lo hacía con toda naturalidad y sin darle importancia.

Como profesor tenía una gran capacidad de síntesis, era muy brillante exponiendo y sus alumnos le entendían muy bien. Era muy asequible y se preocupaba mucho por que aprendieran. Cuando los exámenes no eran correctos, les llamaba uno a uno para hablar con ellos y corregir sus fallos. Les enseñaba también un estilo de ser médicos y ser personas, que no se aprende en los libros. Sus alumnos le querían mucho y eso se plasmaba en que casi todas las promociones que pasaron por sus manos, le nombraban padrino y sus alumnos de Santiago, no sólo le nombraron padrino de promoción sino también padrino de sus bodas de plata, a los veinticinco años de haber dejado Galicia.

Fue un gran universitario, defendió la Universidad contra viento y marea en momentos difíciles, acarreándole a veces grandes disgustos, pero quería a la Universidad y lo consideraba su deber.

En familia, Domingo tenía un carácter maravilloso, era muy estable, no se enfadaba nunca, ya que tenía la virtud de saber callar y también tenía un gran sentido del humor. Era muy ocurrente y muy rápido en sus reacciones mentales, por eso cuando en casa surgía algún problema y él intervenía, el problema perdía importancia y todos sonreíamos.

Fue un hombre de paz, de concordia y de entrega a todos los que le pedían ayuda, fuera cual fuera su condición, ya que tenía un alto concepto de la dignidad humana.

Nosotros, toda su familia, nos sentimos muy contentos por haberle tenido a nuestro lado y damos muchas gracias a Dios por el don inmenso de su presencia, aunque nos haya parecido corta.

Era un hombre de fe, pero nada carca, creía en Dios y confiaba absolutamente en Él, por eso, creo yo, estaba siempre tranquilo y sereno ante cualquier situación adversa, por dura que fuera.

Voy a atreverme a pedir a todos los que queréis a Domingo, que le recordéis, porque creo que el mejor homenaje que se puede hacer a las personas que se nos han ido, es recordarles, pero recordarle con alegría, ya que para los que somos creyentes, él está en su lugar definitivo, que es infinitamente mejor que el nuestro, y ha alcanzado ya la plenitud hacia la que nos encaminamos todos. Para los que no seáis creyentes, también es un motivo de alegría pensar que Domingo, caminó por la vida con gran dignidad y fue un buen testigo de los principios en los que creyó y de las instituciones a las que perteneció (familia, universidad, academias), sobre todo en una época, en que los valores fundamentales están en baja.

Acabo con una frase que me gustó mucho cuando la leí por primera vez, y que últimamente me repito a mí misma muchas veces, dice así: «si lloramos porque se ha puesto el sol, las lágrimas no nos dejarán ver las estrellas». Creo que todos necesitamos poder ver las estrellas, para seguir nuestro camino con ilusión y con esperanza.

Muchas gracias a todos.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Concurso Científico 2005

La Real Academia Nacional de Farmacia (España) convoca el Concurso Científico del año 2005, de acuerdo con las siguientes Bases Generales.

BASES GENERALES

- I. Características de los trabajos presentados a los diferentes premios.
- II. Preparación de manuscritos.
- III. Relación de Premios.
- IV. Recepción de trabajos.

I. Características de los trabajos

1. Podrán optar al Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia trabajos originales de investigación en ciencias farmacéuticas.
2. Podrán optar a otros premios del Concurso Científico trabajos de revisión o investigación sobre ciencias farmacéuticas y afines.
3. Los trabajos se adecuarán al tema específico de cada premio, o en el caso de tema libre, a cualquiera de los incluidos en los objetivos generales de la seis secciones de la Academia (véase anuario o <http://www.ranf.com>).
4. Los trabajos deben ser **inéditos**, escritos indistintamente en español o inglés y redactados específicamente para el concurso de acuerdo con las normas de presentación especificadas. No serán objeto de evaluación los trabajos que, a juicio de la Academia, incumplan esta norma.
5. Los premios se otorgarán a los trabajos, sean éstos unipersonales o colectivos, y el fallo de los jurados será inapelable.

6. Ningún autor que haya recibido el Premio de la Real Academia en una determinada convocatoria podrá aspirar al mismo en la siguiente convocatoria. El incumplimiento de la norma citada anulará el premio concedido.
7. Los trabajos premiados pasan a ser propiedad de la Academia. Una vez publicados, los datos originales sólo podrán figurar en otra publicación con el permiso expreso de la Academia.
8. Los Académicos de Número no podrán figurar como autores de los trabajos presentados a este Concurso Científico.
9. En cada concurso, a propuesta del Jurado, los diferentes premios pueden ser otorgados a un solo trabajo, desglosados en Premio específico y Accésit o declarados desiertos.

II. Preparación y presentación de manuscritos

1. Los trabajos presentados a los diferentes premios del Concurso Científico especificarán en su primera página el **premio al que aspiran** y el **lema de una sola palabra** con que se identifican. El título del trabajo y demás capítulos que lo componen se escribirán en la segunda página y sucesivas.
2. Estarán escritos en Word, en un mínimo de 10 y un máximo de 60 folios A4 numerados por una sola cara, a un espacio y medio, con tipo (fuente) «Times New Roman», 12, y los siguientes márgenes: superior, 6 cm; izquierdo, 4,2 cm; derecho, 4,2 cm; inferior 5,2 cm. Los cuadros, tablas y figuras y sus pies pueden estar incluidos en el texto.
3. Serán remitidos en dos ejemplares cosidos en formato papel y un disquete o CD rotulado con el lema y premio al que aspiran, escrito también en Word o transcrito a PDF.
4. En los trabajos experimentales se recomienda la presentación del siguiente modo:
 - a) Un título conciso, breve y significativo, en español e inglés.

- b) Un resumen o summary de alrededor de 200 palabras y su traducción.
- c) Una introducción breve y documentada que sitúe el trabajo en el contexto científico al que pertenece, con referencia explícita de los trabajos propios o ajenos en los que se apoya. La introducción delimitará con claridad la hipótesis desarrollada o los fines y objetivos que se persiguen.
- d) La exposición de los materiales y métodos empleados, así como las experiencias realizadas. La descripción de las experiencias no contendrá más datos que los necesarios para su reproducibilidad.
- e) Los resultados y su discusión crítica y comparada, así como las conclusiones que se puedan apoyar en los resultados obtenidos.
- f) La bibliografía que se cita.

Se recomienda que en lo referente a los símbolos, formato de bibliografía, tablas y figuras, caracteres de imprenta y demás aspectos de presentación de los manuscritos, se sigan las normas para la presentación de originales especificados en los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia [Vol. LXX (1): 271-274] o en la WEB de la academia arriba indicada.

El resto de los trabajos de investigación o revisiones pueden adoptar, después del título y resumen, un formato libre, con los márgenes de extensión antes indicados.

En ningún caso se identificará implícita o explícitamente el autor o autores del trabajo. Se procurará evitar auto-citas en el texto. Las citas propias se harán tan anónimas como el resto de las indicadas en apoyo de la introducción, métodos y discusión del trabajo.

5. Cada original irá acompañado de un condensado del trabajo, de unas 1.000 palabras de extensión, identificado con el correspondiente lema, redactado en el mismo idioma en que se presenta el trabajo.

6. En sobre cerrado aparte, identificado con el mismo lema y premio al que aspira el trabajo, se incluirá una ficha con el nombre habitual de firma del autor o autores del trabajo, junto con su dirección postal, correo-e, centro de trabajo y teléfonos de localización.
7. Los envíos de originales se realizarán por correo certificado o mediante entrega personal, dirigidos al Presidente de la RANF, Concurso Científico, c/ Farmacia, 11, 28004 Madrid.
8. Los originales no premiados podrán retirarse, una vez publicado el fallo del concurso, antes del 31 de marzo del año siguiente, en que serán destruidos.

III. Relación de premios

PREMIO REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Seis mil euros.

TEMA: Libre, inédito y de investigación.

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO ALCALIBER

Tres mil euros.

TEMA: Cultivo de *Papaver somniferum* y nuevas aplicaciones terapéuticas.

PREMIO CINFA

Tres mil euros.

TEMA: Farmacología, farmacoterapia y seguimiento farmacoterapéutico.

PREMIO FAES FARMA

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO MABO

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO NORMON

Tres mil euros.

TEMA: Investigación y desarrollo de formulaciones galénicas.

PREMIO JUAN ABELLÓ

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA

Seiscientos euros.

TEMA: Libre, sobre técnicas instrumentales en Farmacia.

PREMIO SANTOS RUIZ

No sometido a las bases del concurso. Abono de los derechos de expedición del título de doctor a un doctorando que trabaje en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Los interesados presentarán un ejemplar de la tesis y su expediente académico, dentro del plazo del concurso.

IV. Recepción de los trabajos

Hasta el jueves **27 de octubre de 2005** a las **21 horas**.

Sesiones Científicas

22 de septiembre

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre «Novedades Farmacoterapéuticas: El largo camino de los prostanoides». Coordinador: Excmo. Señor Don A. Villar del Fresno, Académico de Número de la RANF. Ponentes: Excmo. Señor Don J. Tamargo Menéndez, Excma. Señora Doña M.^a Teresa Miras Portugal y Doctor Miguel Gómez Sánchez.

29 de septiembre

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre «Innovación y Medicamentos». Coordinador: Excmo. Señor Don A. Monge Vega, Académico de Número de la RANF. «Innovación de Medicamentos en un nuevo milenio». Ponentes: Excmo. Señor Don J. Prous Cochs, Director General. Ediciones PROUS. «Los medicamentos del año 2004». Excma. Señora Doña C. Avendaño López, Académico de Número de la RANF. «La innovación farmacéutica». Excmo. Señor Don J. Tamargo Menéndez, Académico de Número de la RANF. «Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares».

Noticias

El 1 de julio el trabajo titulado «Auge, declive y evolución de un linaje hidalgo en localidades de Salamanca y Zamora durante los últimos cinco siglos», realizado por nuestro Académico Don José A. Cabezas Fernández del Campo, fue premiado por el Centro de Estudios Salmantinos en su concurso anual. El tema de la hidalguía, tan de actualidad con la conmemoración cervantina del presente año, es tratado por el Profesor Cabezas desde una amplia perspectiva familiar.

* * *

El 5 de julio, la Real Academia de Cataluña, en Junta General, nombró Académica Correspondiente a nuestra compañera, la Excm. Señora Doña Ana Pascual Leone Pascual.

* * *

El 7 de julio se celebró en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, la XIV Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid, FARMADRID XIV, con la participación del Doctor Rodríguez Artalejo y de la Doctora Miras Portugal, miembros de nuestra Corporación.

* * *

El 12 de julio falleció en Madrid nuestro Académico de Número, el Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, que estaba en posesión de la medalla 8.

* * *

El día 1 de septiembre la Académica Correspondiente, residente en Chile, Doctora Carmen Sandoval, fue nombrada Directora del Centro de Referencia de Salud, creado en la Escuela de Farmacia de la Universidad Andrés Bello, de aquel país.

* * *

El día 1 de septiembre, la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto, Académica de Número, impartió en la Universidad de Hidalgo, México, una conferencia sobre «Estallido respiratorio de los fagocitos y su repercusión en la hepatotoxicidad experimental».

* * *

En el número 191 del periódico Correo Farmacéutico (semana del 5 al 11 de septiembre de 2005) aparece una extensa entrevista con la Profesora Rosario de Felipe, Académica Correspondiente, en la que se repasa su trayectoria vital y científica. Además, en el artículo se recoge su perfil como investigadora en el CSIC, donde en los últimos años ha sido Directora del Centro de Ciencias Mediam-ambientales, habiendo ostentado también importantes cargos como el de Presidenta de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal.

* * *

En el mismo número de dicha publicación aparece la noticia de la identificación de un conjunto de genes que producen metástasis del cáncer de mama, trabajo realizado por el equipo de investigación que dirige el Doctor Joan Massagué, Académico de Honor de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

* * *

El 5 de septiembre nos comunicaron el nombramiento como Doctores *honoris causae* de la Universidad de León de nuestros compañeros los Excmos. Señores Don Salvador Rivas Martínez y Don Julio Rodríguez Villanueva, cuya recepción fue el día 26.

* * *

El 5 de septiembre nos comunican el nombramiento del Profesor Monge, Académico de Número de esta Corporación, como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina.

* * *

El día 14 de septiembre, la Doctora Miras Portugal fue nombrada Socio de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular en la Asamblea General celebrada en el Congreso Anual de dicha Sociedad.

* * *

El 19 de septiembre nos comunican el nombramiento de nuestro compañero el Profesor Mayor Zaragoza, como co-Presidente de la Comisión de Alto Nivel de la ONU, para estudiar la propuesta del Gobierno de España, de la Alianza de Civilizaciones.

* * *

El 26 de septiembre, en Junta de Gobierno de esta Corporación, fue reconocido formalmente el nombramiento del Profesor Doctor Don Obdulio Fernández como Académico de Honor.

* * *

El 29 de septiembre fue elegido Presidente de la Sección de Historia, Legislación y Bioética, el Excmo. Señor Don Román de Vicente Jordana.

Necrológica

El Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, Medalla número 8 de la Real Academia Nacional de Farmacia, de la que fue secretario entre 1991 y 1997, falleció en Madrid el día 12 de julio de 2005.

Nació en Madrid, el 31 de diciembre de 1923. Doctor en Farmacia y Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Académico de Número de la Real Academia de Doctores. Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia del Perú. Profesor de Investigación del CSIC (jubilado). Ex Consejero adjunto del «Patronato Ramón y Cajal» del C.S.I.C. Ex Vocal de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno. Ex Director del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana. Ex Director del Centro de Investigaciones Biológicas. Técnico Bromatólogo. Diplomado en Sanidad y Oficial Sanitario por la Escuela Nacional de Sanidad. Profesor Ayudante de la Cátedra de Análisis de Medicamentos Orgánicos y de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia (U.C.M). Premio «Clariana» de la Real Academia de Farmacia. Premio de Investigación «Alonso Herrera» del C.S.I.C. Premio de la «Real Academia de Farmacia». Premio «Smith Kline & French». Premio de Investigación «Lab. Jorba, S. A.». Ha sido Miembro de la New York Academy of Science, de la International Society of Chemotherapy y de la American Society for Microbiology. Socio fundador de la Mediterranean Society of Chemotherapy. Miembro fundador de la Sociedad Española de Microbiología y de la Sociedad Española de Espectroscopía. Miembro de la Sociedad de Inmunología. Miembro Emérito de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Del Cuerpo de Farmacia del Ejército del Aire. Diplomado en Medicina Aeronáutica por el C.I.M.A. Está en posesión de la Cruz y de la Placa de la Orden de San Hermenegildo.

Estos meritos y honores eran el resultado de su esfuerzo y tesón, y el reflejo de una gran personalidad enriquecida con sus facetas de escritor y pintor. Como compañero de la Real Academia Nacional de Farmacia, se hacía notar por su excelente humor y su espíritu positivo. En su rostro de corte griego, como las estatuas clásicas, siem-

pre existía una sonrisa, y su mirada inteligente y penetrante nos hacía comprender sus muchos años de trabajo y su amplio conocimiento. Todos los miembros de esta Academia nos unimos al dolor de su familia, su esposa, M.^a Teresa, sus hijos, M.^a Teresa, M.^a Pilar, Antonio y José María, todos ellos seguidores de la vocación investigadora y clínica de sus padres.

Por estas casualidades de la vida, al inicio de sus memorias, recuerda cómo le despertó su padre la mañana del 12 de julio de 1936. El tren no espera, le dijo, y comenzó así su prolongado viaje a Olmedo. Que el viaje emprendido otro 12 de julio, pero 69 años más tarde, discurra por los más plácidos y hermosos paisajes. Su recuerdo permanecerá entre nosotros y su espíritu vivirá en nuestra memoria. Que descanse en paz.

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL
Directora de los Anales de la RANF

* * *

El 1 de marzo de 2005 falleció el Profesor Don Simón Pérez Alva, Académico Correspondiente en Perú, que se incorporó como tal el 9 de noviembre de 1951. En su trayectoria académica en la Academia Peruana de Farmacia fue dirigente de la misma y Presidente del Primer Congreso que esta institución organizó. Era Académico Honorario y estaba en posesión de la Medalla de la Academia.

En su trayectoria profesional en la Universidad Nacional de San Marcos y en la Facultad de Farmacia y Bioquímica realizó una gran labor docente e investigadora en el ámbito de la Microbiología, iniciando en esta materia a muchos alumnos. Fue Director Fundador del Departamento de Microbiología y Parasitología. En la Universidad desempeñó diversos cargos de responsabilidad, así los de Director de Postgrado, Decano y Vicerrector. Hoy día, a petición de la Academia Peruana de Farmacia, el Consejo de Gobierno de la Facultad ha aprobado por unanimidad que el Auditorio de Postgrado lleve su nombre.

En el ejercicio libre de la profesión, el Doctor Pérez Alva fue copropietario, junto a Don Marco Antonio Garrido, del Laboratorio

BIOSA, que se convirtió en pionero en el campo de la fabricación de vacunas y alergenos en Perú.

Le deseamos que se encuentre gozando de la Paz del Señor.

FERNANDO QUEVEDO GANOZA

Delegado de la Real Academia Nacional de Farmacia en Perú

Bibliografía

Formularios de Hospitales Españoles. Siglos XVII y XVIII.—Suñé Arbussá, J. M.^a—2005.—Biblioteca de Ciencias de la Salud 3. Granada.—Universidad de Granada.—ISBN: 84-338-3256-5.—115 págs.

En este libro el Profesor José María Suñé Arbussá, partiendo de la conferencia magistral que impartió en el Aula Magna de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada el 29 de octubre de 2002, de las investigaciones que se han llevado a cabo, bajo su dirección, en las Facultades de Farmacia de las Universidades de Granada y Barcelona y de su búsqueda personal, presenta una suma de nuevas aportaciones al conocimiento de los Formularios de Hospitales Españoles de los siglos XVII y XVIII. El Doctor Suñé ordena su obra en doce partes, ocho de las cuales están dedicadas monográficamente a la recopilación de dichos formularios. En «Antecedentes» señala la intención del preparador de medicamentos para plasmar por escrito las fórmulas de medicamentos más usuales; «Las Farmacopeas», en que hace especial hincapié sobre las publicadas en España como repertorios oficiales de simples y compuestos; «Los Formularios» que recogían las fórmulas de medicamentos usuales en una región o localidad; «Los Formularios de Hospitales», que proporcionaban un conocimiento real de la terapéutica utilizada en ellos; «El *Particulares medicamentorum* del Hospital de Santa Creu de Barcelona» (1677); «El «Sinopsis Formularum» del Nosocomio General de Barcelona (1741, 1742 y 1749); «Los Formularios de Félix de Eguía», que comprende el *Formulario de Medicamentos* utilizado en los Reales Hospitales de Madrid (1750, 1759, 1771 y 1785), así como el *Formulario o Recetario Quirúrgico* (1750, 1758, 1769 y 1785) empleado en los Hospitales de Madrid; el «Formulario médico-quirúrgico gaditano de 1752», utilizado en el Real Nosocomio Marítimo de Cádiz; «La Farmacopea de la Armada de Leandro de Vega, de 1760», edición bilingüe en latín y castellano que gozó en Cádiz de tres impresiones en ese mismo año y considerada como una obra necesaria para su uso en la Real Armada; «Formulario del Hospital del Cardenal, de Sevilla, de 1763»; «Los Formularios de Cartagena» para uso del Hospital de la Armada de esa ciudad (1789 y 1795), y el «Formulario de Madrid de 1789» para utilización en los Reales Hospitales General y Pasión.

El Doctor Suñé realiza para cada uno de los Formularios citados un estudio pormenorizado que se refiere al autor, al contenido de la obra, descripción de la misma, bibliografía, ejemplares conocidos y su localización en bibliotecas españolas o foráneas e incluye además como ilustraciones las portadas de los ejemplares localizados.

Como es tradicional en los escritos del Doctor Suñé, el estudio que ahora presenta sobre los Formularios de Hospitales Españoles en los siglos XVII y XVIII es muy completo y se atiene en él a una de sus más importantes líneas de trabajo, que es el pasado histórico de la Farmacia Hospitalaria y el estudio de Libros Antiguos de Farmacia relacionados con el Medicamento, libros que, como él mismo dice en la Introducción, siempre le «han sido especialmente atractivos».

Con esta obra el Doctor Suñé pone a disposición de los historiadores de la farmacia un texto que contribuye a llenar, como indica el Profesor José Luis Valverde en la Presentación del mismo, «uno de los grandes vacíos de nuestro pasado histórico».

M.^a DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

* * *

Ética en la industria farmacéutica: entre la economía y la salud.—López Guzmán, J.—2005.—Pamplona.- Ediciones Universidad de Navarra (EUNSA).—ISBN: 84-313-2290-X.—174 págs.

El Profesor José López Guzmán, Doctor en Farmacia por la Universidad de Valencia, está adscrito al Departamento de Humanidades Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra y su actividad docente se desarrolla impartiendo la disciplina «Deontología Farmacéutica» en la Licenciatura de Farmacia, en el Máster I+D+i y en la especialización de Farmacia Galénica e Industrial. Además es Director del Máster de Bioética de la Universidad de Navarra. Las inquietudes del Doctor López Guzmán en el campo de la Deontología y de la Ética farmacéutica se han visto reflejadas en diversas publicaciones de interés sobre estos temas que han abordado diferentes perspectivas del quehacer farmacéutico.

El libro se estructura en dos partes bien diferenciadas. En la primera parte, titulada «La ética, entre el “poder” y el “deber”», el autor define y justifica, según sus propias palabras, «la necesidad del

conocimiento de unos principios de ética profesional». Consta de cuatro puntos: 1. Introducción. 2. El conflicto entre «poder y deber». 3. Aproximación a la ética, y 4. La conciencia.

En la segunda parte, que constituye la parte principal y más extensa del libro, titulada: «¿Es posible la ética en la industria farmacéutica?», el autor señala que «efectúa una exposición y reflexión sobre aquellos aspectos deontológicos concretos que afectan a la industria farmacéutica». Comprende seis puntos: 1. Ética empresarial, en el que se ocupa del compromiso ético de la empresa; 2. La industria farmacéutica, su concepto y acciones del directivo en ella; 3. Códigos deontológicos de la industria farmacéutica, concepto y clases con especial referencia al Código Español de Buenas Prácticas para la promoción de los medicamentos; 4. Cuestiones de ética en la industria farmacéutica, en que se tratan aspectos particulares que se refieren a la promoción de los medicamentos, la divulgación al público de conocimientos acerca de éstos, a la competencia desleal, a la formación continuada, a la adaptación e innovación, al conflicto de intereses y a la objeción de conciencia. Este punto se enriquece con ejemplos que ilustran el texto bajo el epígrafe «Material de trabajo», al igual que sucede en el punto 5, en que se trata de la industria farmacéutica y el acceso a la salud de los grupos sociales desfavorecidos y en particular a los precios como factor que limita el acceso al medicamento, la ayuda de las compañías farmacéuticas a los países del Tercer Mundo y la labor de las ONG asociadas en ocasiones a la industria farmacéutica. Por último, el punto 6 se dedica a Responsabilidad social de la empresa farmacéutica y su valoración.

Este texto, que el autor acompaña de una abundante y seleccionada bibliografía específica, como afirma el Excmo. Señor Don Antonio Monge Vega en el Prólogo del mismo, «cubre una necesidad en la bibliografía internacional», por lo que «será de consulta obligada por todas aquellas personas relacionadas con el mundo del medicamento y su entorno», y en él quedan perfectamente delimitados los principios éticos en la industria farmacéutica, en la sociedad actual y la relación que los medicamentos elaborados por las empresas farmacéuticas tienen con la economía, la salud y el bienestar de los pacientes en el mundo globalizado que nos ha tocado vivir.

M.^a DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Política Editorial

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral que publica trabajos de investigación básica o aplicada relacionados con las ciencias farmacéuticas y afines.

2. Serán aceptados y considerados para publicación, aquellos manuscritos que no hayan sido publicados previamente (excepto resúmenes), que actualmente no estén siendo revisados en otras revistas, que su publicación haya sido aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables de los laboratorios donde se ha desarrollado el trabajo, y que si es aceptado, no será publicado en otra revista en la misma forma, en el mismo o diferente idioma, sin el consentimiento de los Editores.

3. El manuscrito original, una copia y la versión electrónica en CD, se enviará, con la correspondiente carta de presentación, a la siguiente dirección:

Doctora María Teresa Miras Portugal
 Editora de los ANALES DE LA REAL
 ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
 Real Academia Nacional de Farmacia
 C/ Farmacia, 11
 28004 Madrid
 España
 Fax: 91 531 03 06

Existe la posibilidad de enviar el manuscrito en formato electrónico como archivo adjunto a la siguiente dirección: edicion@ranf.com. Tanto el texto como las figuras deberán ser enviadas en archivos separados. Los formatos aceptados son: .doc (Word) para el texto, y formato TIFF, JPG o PPT (Power Point) para las figuras.

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

— REVISIONES: no deben tener una extensión superior a las 4.000 pala-

bras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones deben contactar previamente con el Editor.

- ARTICULOS ORIGINALES: no deben tener una extensión superior a 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas.
- COMUNICACIONES BREVES: artículos breves y definitivos. El manuscrito debe ser identificado como tal en la carta de presentación. La extensión no sobrepasará las 2.500 palabras incluyendo la bibliografía (no más de 10 citas) y con un máximo de tres figuras/tablas.
- CARTAS AL EDITOR: no deben superar las 1.000 palabras de extensión con un máximo de tres citas bibliográficas. Las cartas deben enfocarse en comentar artículos publicados previamente, o tratar diferentes aspectos de Política Educativa, Sanitaria y Ciencias Farmacéuticas.
- INFORMACIÓN ACADÉMICA: esta sección dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros, novedades editoriales y otros eventos que la revista considere de interés para los lectores.

B. Organización de los manuscritos

Todos los elementos o partes del manuscrito deben ir a doble espacio, todas las páginas numeradas en la esquina superior derecha empezando en la página de la portada. Los manuscritos referentes a artículos originales deberán

contener, en este orden, los siguientes apartados:

1. PORTADA

Título

Debe ir tanto en español como en inglés. Tendrá una extensión inferior a los 100 caracteres, excluyendo los espacios entre palabras.

Nombre de los autores

El nombre completo de todos los autores y su afiliación institucional. En los trabajos que tengan más de un autor y más de una Institución, indicar la afiliación individual mediante números en superíndices.

Palabras Clave

Cinco palabras clave (en español y en inglés) que no aparezcan en el título.

Información de contacto

Nombre, dirección postal, número de teléfono, fax y dirección de correo electrónico del autor al que se enviarán las galeras.

Lista de Abreviaturas

Las abreviaturas y su significado deben incluirse en una lista en el mismo orden en el que se mencionan en el artículo.

2. PÁGINA DEL RESUMEN

Incluirá el resumen del artículo en español y en inglés. Deberá escribirse como texto continuo y se organizará del siguiente modo: una pequeña introducción donde se expliquen los antecedentes y los objetivos del trabajo, principales resultados y, finalmente, las conclusiones. Su extensión no debe superar las 250 palabras.

3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

• INTRODUCCIÓN

Exponer información principal y antecedentes del tema que puedan orientar al lector.

• MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

En esta sección se explicarán los métodos experimentales empleados en el trabajo con un nivel de detalle suficiente que permita a otros investigadores repetir el trabajo; para aquellos métodos empleados sin modificaciones significativas respecto al método original, la citación del trabajo original será suficiente.

Experimentación en humanos

En aquellos trabajos de investigación que requieran de seres humanos, se deberá proporcionar: (a) consentimiento por escrito de cada paciente o sujeto sano; (b) el protocolo del estudio conforme con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, reflejado por la aprobación del comité apropiado de revisión de la institución. Se hará referencia a cada paciente mediante números, no mediante iniciales.

Experimentación animal

En los estudios en los que se emplee experimentación animal, se asegurará que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH) publicación 86-23, revisada en 1985).

Fabricantes y proveedores

Incluir los nombres y las localidades (ciudad y estado o país) de los fabricantes y proveedores cuando se mencionen fármacos, instrumentación, aparatos, software, etc.

• RESULTADOS

Se presentarán los principales hallazgos del estudio en forma gráfica cuando sea posible. No ilustrar los pequeños detalles si su información puede ser descrita adecuadamente mediante texto.

• DISCUSIÓN

En esta sección se presentarán de forma concisa las implicaciones de los nuevos hallazgos en el campo que corresponda, minimizando la reiteración de los resultados, evitando la repetición de información dada en la introducción, y ajustándose al enfoque y objetivo inicial del trabajo.

• AGRADECIMIENTOS

Se incluirán los agradecimientos al personal de apoyo y a proveedores de reactivos especiales. Las becas y ayudas financieras se deberán incluir en esta sección.

• BIBLIOGRAFÍA

Las citas bibliográficas tienen que numerarse entre paréntesis en la línea de texto, por ejemplo (7), o (11-13,17), en el orden de citación en el texto. La bibliografía se incluirá al final del artículo. Sólo se podrán citar como artículos «en prensa» a aquellos de los que se incluye una copia de la carta de aceptación en el envío inicial. Las citas deben incluir el título completo del artículo y citarse en el siguiente formato:

Ejemplos de revistas (1) (2) y libros (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B.J. y SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. y NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. en: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

- (4) FELDMANN, H. (2004) *Forty years of FEBS*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• TABLAS

Cada tabla debe ir preparada en hoja individual, a doble espacio y numeradas consecutivamente con números arábigos en el orden en el que aparecen en el texto. No duplicar material que ya haya sido presentado en una figura.

• LEYENDAS DE FIGURA

Las leyendas deben ir numeradas con números arábigos en el mismo orden en el que aparecen en el texto. El título de la leyenda de la figura no debe aparecer dentro de la propia figura, y debe proporcionarse suficiente información para que la figura sea inteligible sin hacer referencia al texto. Dentro de la leyenda deben ser explicados todas las abreviaturas y símbolos. Las leyendas de figura aparecerán todas de manera consecutiva en hoja aparte.

• FIGURAS

La revista solicita un juego completo de figuras. En el reverso de cada figura debe ir marcado en lápiz el número de cada figura, su orientación y el nombre del primer autor.

Blanco y negro

La revista alienta el envío de figuras en blanco y negro. Éstas deben ser impresiones láser de dibujos en blanco y negro y fotografías en brillo de alto contraste de todas las figuras de semitono, por ejemplo, microfotografías, geles, etc.

Color

Proporcionar impresiones en papel brillante donde los símbolos y texto se aprecien claramente frente al fondo de la figura. El Editor y el Comité Editorial seleccionarán las figuras en color que serán publicadas.

Las figuras en color deben tener un alto contraste, sin fondo coloreado y con la posibilidad de aparecer en blanco y negro en la versión impresa de la revista.

Como se indicó previamente, si el envío del manuscrito se realiza vía e-mail, no es necesario mandar el juego completo de figuras impreso en papel.

PERMISOS

Citaciones directas, tablas o ilustraciones tomadas de material protegido por copyright, deben ir acompañadas del permiso escrito del Editor y el autor original para poder ser utilizadas.

REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los manuscritos enviados para publicación serán revisados por dos evaluadores del área de referencia del trabajo. El Editor elegirá los evaluadores más apropiados para cada manuscrito. El manuscrito que requiera más de una revisión o que en el plazo superior a dos meses no sea remitido a la revista desde la decisión editorial inicial, se considerará como un nuevo envío.

La revista no realiza cargos por página. Una vez que el trabajo ha sido publicado, se envían 25 copias impresas del mismo al autor. También se proporcionará la versión en PDF del artículo.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

A. Editorial Policy

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* is a quarterly journal that publishes basic and applied research on pharmaceutical sciences and related areas.

2. A manuscript is accepted for consideration for publication with the understanding that it has not been published elsewhere (except in abstract form), that it is not concurrently under review elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and the Publisher.

Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright.

The journal publishes articles written in Spanish or English.

3. An original, a copy, and the electronic version on CD of the manuscript should be sent with a cover letter to:

María Teresa Miras Portugal PhD.
Editor, ANALES DE LA REAL
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Real Academia Nacional de Farmacia
C/ Farmacia, 11
28004 Madrid
Spain
Fax: 91 531 03 06

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: edicion@ranf.com. The text and the figures should be submitted in separate files. The accepted formats are: .doc (Word) for the text, and TIFF, JPG or PPT (Power Point) for figures.

4. Types of Manuscript.

The journal will consider and publish the following:

- **REVIEWS:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, references, title page but including legends to figures and tables) and the reference list need not be exhaustive (no more than 40). While most reviews are invited by the Editors, authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor.
- **ORIGINAL ARTICLES:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, title page, and references, but including legends to figures and tables), and include no more than 40 references.
- **RAPID COMMUNICATIONS:** brief, definitive reports. The manuscript should be identified as such in the cover letter. The length should no longer than 2,500 words including references (no more than 10) and with a maximum of three figures/tables.
- **LETTERS TO THE EDITOR:** should be no longer than 1,000 words and include no more than three bibliographic references. Letters should focus on commenting or enlarge previous published articles, or deal with some aspects of educational or sanitary policy and pharmaceutical sciences.
- **ACADEMIC INFORMATION:** this section will inform about different courses, scientific sessions and others events that the journal deem appropriate.

B. Manuscript Organization

All elements of a manuscript should be double-spaced, and all pages must be numbered in the upper right corner, starting with the title page. Manuscripts describing original research should contain, in this order, the following elements:

1. TITLE PAGE**Title**

It must be in Spanish and in English. No more than 100 characters, not including spaces between words.

Author Names

The full names of all authors and their institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number.

Keywords

Five keywords (in Spanish and in English) that do not appear in the title itself.

Contact Information

Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address for author to whom proofs should be sent.

List of Abbreviations

Include the expansions and list in the order of their mention in the paper.

2. ABSTRACT PAGE

Should contain the summary in both Spanish and English. Write as continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. Do not exceed 250 words.

3. MANUSCRIPT SECTION**• INTRODUCTION**

Provide the minimum background information that will orient the general reader.

• MATERIAL AND METHODS (EXPERIMENTAL PROCEDURES)

Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification,

citation of the original work will suffice.

Human Subjects

For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

Animal Experimentation

In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

Manufacturers

Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

• RESULTS

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures.

• DISCUSSION

In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

• **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Grant and other financial support should be listed in this section.

• **REFERENCES**

These should be numbered in parentheses on the line, e.g. (7), or (11-13,17), in order of citation in the text. The list of references will be printed at the end of the paper. Articles may only be cited as «in press» if a copy of the acceptance notice is supplied at the time of submission. References should include the title of the article and be cited as follows:

Examples of journals (1) (2) and books (3) (4):

- (1) MACKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B. J. & SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. & NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• **TABLES**

Prepare tables on individual sheets of paper, double-spaced, and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

• **FIGURE LEGENDS**

Number with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. Type figure legends consecutively on a separate sheet of paper.

• **FIGURES**

The Journal requires *one* set of figures. Mark the back of each figure in pencil with the figure number, its orientation, and the name of the first author.

Black and White

B/W figures are encouraged. Provide clean laser prints of black and white drawings and high-contrast glossy 18-cm-wide photographs of all halftone figures, e.g., photomicrographs, gels, etc.

Colour

Provide glossy prints in which lettering and symbols are clearly visible against the background. The Editor and the Editorial Committee will select the colour figures to be published.

As for the printed figures they should be contrasted, without colour background, and with possibility to appear in black and white in the printed version.

As indicated, if submission is carried out via e-mail, no printed figures are required.

PERMISSIONS

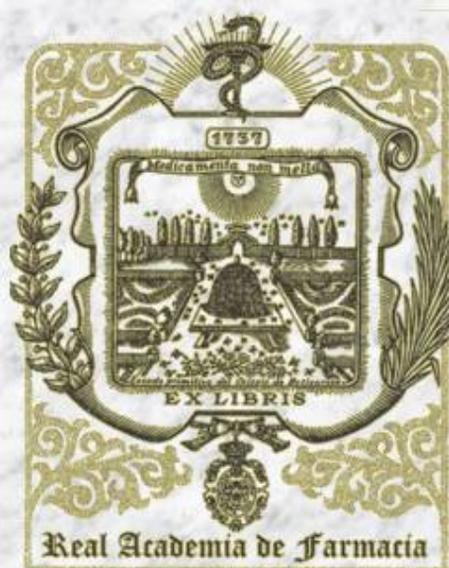
Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

PEER REVIEW AND PUBLISHING

The Journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. The Editor will choose the appropriate reviewers for each manuscript. A manuscript requiring more than a single revision or returned

beyond 2 months of the date of the initial decision will be considered a new submission.

There are no page charges. Twenty-five offprints are provided free of charge to the corresponding author of each accepted article. The article in PDF version is also provided.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com