

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2006

VOLUMEN LXXII

Núm. 1

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

**Einstein: 100 años de Relatividad.
Ideas fundamentales para las Ciencias
Farmacéuticas**

Recibido el 23 de diciembre de 2005

FRANCISCO GONZÁLEZ DE POSADA

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia y Numerario de la Real Academia Nacional
de Medicina*

RESUMEN

El punto de partida es una reiterada reflexión en torno a las Ciencias Farmacéuticas cuyo contenido se concreta mediante la expresión «La Farmacia: de la Física a la Biología», espectro de casi toda la gama de las ciencias básicas de la Naturaleza. Así, la Física es un fundamento de la Farmacia, como lo es de todas las ciencias; y una parte de la Física constituye el contenido de las Ciencias Farmacéuticas. En este contexto disciplinar, y en la conmemoración del Año Internacional de la Física, se responde a la pregunta: ¿La Relatividad tiene algo que aportar en el ámbito de las ciencias farmacéuticas?

Se catalogan las *revoluciones intelectuales* introducidas por las Teorías de la Relatividad Especial y General bajo la expresión de *horizontes abiertos*, por y desde la Física, hacia otros ámbitos del pensamiento científico y filosófico.

Y a la luz de dichos *horizontes abiertos* se concretan las *ideas fundamentales* que se constituyen en concepciones básicas del pensamiento científico con validez general para las Ciencias Farmacéuticas. Estas ideas se designan por los términos: *estructura, respectividad, dinamicidad y emergencia*.

Dichos términos son *propiaamente zubirianos*, pero, aunque se utilizan éstos expresa y directamente, se hace ver que sus interpretaciones y su establecimiento son distintos. Por otra parte, se destacan: a) la aplicabilidad de dichas ideas a la propia Relatividad; y b) la naturaleza problemática de la noción de teoría, del trasfondo de creencia científica y de la matematicidad de la Naturaleza.

Palabras clave: Farmacia.—Física.—Biología.—Relatividad.—Einstein.—Estructura.—Respectividad.—Dinamicidad.—Emergencia.

ABSTRACT

Einstein: 100 years of Relativity. Fundamental ideas for the Pharmaceutical Sciences

The starting point is a reiterated reflection about the Pharmaceutical Sciences whose contents are made specific by the expression «Pharmacy: from Physics to Biology», a spectrum which covers almost all range of the basic natural sciences. Thus, Physics is a basis for Pharmacy as it is for all the sciences, and one part of Physics constitutes the content of the Pharmaceutical Sciences. In this disciplinary context, and with the commemoration of the International Year of Physics, the following question is answered: does Relativity have a contribution to make in the field of the pharmaceutical sciences?

The *intellectual revolutions* introduced by the Special and General Theories of Relativity are catalogued beneath the expression, *open horizons*, for and from Physics towards other areas of the scientific and philosophical thought.

And in the light of the above-mentioned *open horizons*, the *fundamental ideas* are made specific which constitutes the basic conceptions of scientific thought with general validity for the Pharmaceutical Sciences. These ideas are designated by the terms: *structure, respectivity, dynamicity and emergency*.

These terms are *indeed Zubirian*, but although they are used expressly and directly, it can be seen that their interpretations and their establishment are different. On the other hand, the following stand out: a) the applicability of the said ideas to Relativity itself, and b) the problematic nature of the notion of theory, of the background of scientific belief and of the mathematical nature of the Nature.

Key words: Pharmacy.—Physics.—Biology.—Relativity.—Einstein.—Structure.—Respectivity.—Dynamicity.—Emergency.

A MODO DE INTRODUCCIÓN

La Asamblea General de las Naciones Unidas decidió declarar el presente año 2005 como **Año Internacional de la Física**, solicitando a la UNESCO la organización, coordinación y difusión de la conmemoración del *annus mirabilis* de Einstein, año 1905, en el que escribió un conjunto de artículos de primera categoría. A lo largo de este año se me ha concedido el honor de participar en diferentes foros y de escribir algunas páginas como libro (1) y en revistas (2).

La Real Academia Nacional de Farmacia ha querido unirse hoy a la conmemoración einsteiniana, y para esta ocasión he procurado concebir una orientación especial, saliendo propiamente de la física y, por la vía de las revoluciones filosóficas de las Teorías de la Relatividad, aproximarme al ámbito de las ciencias biológicas.

1. EN TORNO A LAS «CIENCIAS FARMACÉUTICAS»

1.1. La Farmacia: de la Física a la Biología

En un trabajo anterior (3) se ofrecieron unas reflexiones relativas a la concepción y elementos integrantes de las que pueden considerarse como «ciencias farmacéuticas». A él remitimos al lector, destacando aquí sólo algunas ideas.

La **Farmacia** se presenta como espectro; en ciencia y en tanto que ciencia es un espectro, nada menos que el **espectro de toda la gama de las ciencias básicas de la Naturaleza**, el espectro que abarca de la Física a la Biología integrándolas.

La **Física** debe considerarse como **conjunto de teorías físicas**.

La **Biología** actual no es ni propia ni exactamente *una* ciencia; es también un conjunto de «teorías» (ζ) biológicas, mejor diríamos, con mayor precisión, de *disciplinas biológicas*, caracterizadas prioritariamente por sus respectivos referentes u objetos de estudio.

La **Farmacia**, en su concepción científica, **transita de la Física a la Biología y de la Biología a la Física**. Estas ciencias constituyen sus límites. Desde éstos, la Física se acerca, por numerosos vericuetos, pero sobre todo **por el puente de la Química**, hacia la Farmacia; la Biología actual se desplaza desde lo celular hacia lo molecular.

La **Farmacia**, en tanto que ámbito del saber, es compendio de saberes, más que una disciplina científica, **integra múltiples diferentes saberes**. Con otras palabras más poéticas nuestro Presidente ha escrito (4) que «La Farmacia es una encrucijada de caminos, científicos y sanitarios».

La Física es fundamento de la Farmacia. Pueden recordarse aquí otras palabras de Reol referidas a ella: «Farmacogenómica,

biotecnología, farmacoterapia, bioética, ... conviven con las clásicas (e imprescindibles) de física, química y biología» y «las ciencias básicas [son] soporte de la ciencia farmacéutica (la biología, la química, la física)» (5).

Esta Real Academia, en sintonía con este trasfondo científico, ha estado y está estructurada en comisiones. En los Estatutos recientemente antiguos (6): la 1.^a, Ciencias Físico-Químicas. En los Estatutos actuales (7), se ha ampliado el número y actualizado sus denominaciones; así, la 1.^a, Química y Física. Como hecho social, en la Academia hay excelentes químicos y biólogos, y en número relevante, pero no físicos.

1.2. La Física como ciencia farmacéutica

Permítanme también unas primeras reflexiones generales que faciliten la consideración de la Física como ciencia integrable en el conjunto de las ciencias farmacéuticas, y hacerlo sintéticamente con referencia a lo escrito en el discurso de ingreso (3).

1. La **Física** (y con ella la Química) trata con, o se refiere a, presupuestamente al menos, el Cosmos, el Todo y lo que en éste acaece, presupuestamente también (y utilizando las categorías fundamentales de espacio, tiempo y materia), en todas partes, en todo tiempo y en todo cuerpo. Es una ciencia plenamente **universal**.

2. La **Biología** (como la Geología, aunque ésta ya vislumbra otros horizontes extraterrestres) es una ciencia **terrenal**. Su referente no es la Vida, es sólo la vida terráquea, la vida en la Tierra (aunque pudiera, lo que no parece probable, ser la única vida cósmica).

3. Una parte fundamental de la Física es la **Física cuántica** que, entre otros temas, «describe» la estructura de las pequeñas partículas. Desde su éxito físico quiso, ha querido y quiere aplicarse «directamente» a los organismos (8).

4. La **Termodinámica** es una teoría física clásica «especial» que tiene, como hemos escrito con reiteración, pretensiones de *universalidad* (para todo cuerpo, en todo lugar y en todo tiempo), *gene-*

ralidad (para todos los fenómenos, de cualquier tipo) y *totalidad* (para todas las teorías físicas).

5. A la luz de la consideración anterior puede afirmarse que **los organismos están sujetos a las leyes de la Física** (mejor sería decir, de la Naturaleza) en tanto que (también) objetos físicos y en lo que respecta a los fenómenos físicos. Esto es muy diferente de que las leyes de la Física sean suficientes para explicar los procesos biológicos.

6. La **Física** actual no es ni propia ni exactamente *una* ciencia, es un **conjunto de teorías físicas** con diferentes trasfondos filosóficos y matemáticos, con distintos referentes, con diversas representaciones parciales, ideales y, ¡esto también!, matemáticas.

7. Desde la perspectiva de la *constitución* de los organismos superiores, podría decirse que debería transitarse «de la Física a la Biología».

8. La Física no es *una* (adjetivo numeral) ciencia sino un conjunto de muchas teorías físicas. La Biología tampoco es *una* ciencia sino un conjunto de disciplinas científicas. La **Farmacia** tiene una fundamental **concepción científica que integra y precisa saberes científicos que van**, precisamente en acuerdo con el título del párrafo 1.1., «**de la Física a la Biología**». Y no sólo profesión clásicamente científica sino además —quizá sobre todo, aunque sea salirnos de nuestro campo de hoy— profesión sanitaria humana que en su marcha al encuentro de la persona en la búsqueda y recuperación de su salud ha enriquecido el panorama científico con otras disciplinas como Farmacología, Farmacotecnia, Farmacogenética, Farmacoterapia, etc.

9. De este modo, **la Física**, aunque situada en **un extremo del espectro de las ciencias de la Naturaleza**, exterior al ámbito de la Biología, no sólo está presente sino que por tratarse de ciencia fundamental debe estar siempre presente (9).

1.3. Einstein, la Relatividad y... la Farmacia

En este contexto de pertenencia de la física al conjunto de las ciencias farmacéuticas, pero no de toda la física, cabe preguntarse:

¿Einstein y la relatividad tienen algo que ofrecer en el ámbito de las ciencias farmacéuticas? En primera impresión, y por referencia a las teorías de Newton, la dinámica —como ciencia del movimiento— y la atracción universal —como ciencia de la gravitación—, las Teorías de la Relatividad de Einstein son ciencia del movimiento (la Relatividad Especial) y de la gravitación (la Relatividad General). Así puede formularse otra pregunta: **¿Las teorías de Einstein no son fundamentos de física y, en todo caso, filosofía?** Ciertamente, debe considerarse que las teorías de Einstein pertenecen en parte importante al ámbito de los fundamentos, prioritariamente de física, en ésta nacieron y para ésta se concibieron... pero trascendieron relativamente pronto de ella... inundando la filosofía e integrando el pensamiento científico general.

No es fácil abordar este tema de la relación de las teorías de Einstein con las ciencias farmacéuticas pero en esto consiste el reto. Y nos vamos a enfrentar con él desde la perspectiva de los fundamentos más radicales. Veremos antes, desde este punto de vista, cuáles han sido las *revoluciones intelectuales* introducidas por las Teorías de la Relatividad de Einstein y/o los *horizontes* que éstas han abierto al pensamiento científico y a la filosofía.

2. LAS REVOLUCIONES INTELECTUALES DE LA RELATIVIDAD: LOS HORIZONTES ABIERTOS

2.1. Antecedentes de este trabajo

De nuestros encuentros anteriores con las teorías de Einstein pueden recordarse diferentes ámbitos tratados en relación más o menos directa con dichas teorías, refiriendo algunas de nuestras publicaciones, a modo de *antecedentes* de este trabajo, y de las que no consideramos oportuno repetir nada: a) En primer lugar, unos antecedentes propia y exclusivamente *matemáticos* (10), (11) y (12); b) Próximos a éstos, propiamente de *física matemática*, pueden considerarse algunas de las obras de la colección «En torno a Blas Cabrera Felipe», que tengo el honor de dirigir (13), (14) y (15); c) Otros, desde una perspectiva *histórica* (16) y (17); y d) Con un enfoque

prioritariamente *filosófico* (18), (19) y (20). Unidos a estos antecedentes deben considerarse las obritas de este año 2005 publicadas con ocasión del Año Internacional de la Física referidos en la Introducción. Ante este extenso panorama manifiesto la intención de aportar algo nuevo, aunque sólo fuera como recreo intelectual, y la esperanza de que pueda interesar en algún sentido en este ámbito selecto de la Farmacia.

En algunos de los textos citados anteriormente —prioritariamente en (1), (19) y (20)— hemos establecido un conjunto de *revoluciones intelectuales* explícitas e implícitas en las Teorías de la Relatividad de Einstein que he denominado *horizontes abiertos* por ellas, ya que han trascendido desde la física penetrando en los confines del pensamiento científico y filosófico. En este último ámbito suele recordarse que a dichas revoluciones se deben los movimientos filosóficos más importantes del siglo xx, como pueden considerarse el Círculo de Viena, la metodología de la ciencia de Popper y el operacionalismo de Bridgman. No suele dársele trascendencia alguna en el sentido de que estas ideas hayan penetrado en los ámbitos de las ciencias no físicas. Aquí radica nuestro interés en el día de hoy.

Pero volvamos a los *horizontes abiertos* por las Teorías de la Relatividad organizados en los tres períodos que las han constituido.

2.2. Horizontes abiertos por las Teorías de la Relatividad de Einstein

Se construye a continuación una organización elaborada de las principales ideas explícitas e implícitas que, a mi juicio, constituyen las características novedosas, revolucionarias, de las Teorías de la Relatividad.

Estas *ideas* se clasifican históricamente. Primero, las correspondientes a la Relatividad Especial, distinguiendo las debidas a los artículos de 1905 de Einstein y las debidas a Minkowski de 1908. Segundo, las correspondientes a la Relatividad General de 1915. Esta perspectiva conjunta facilita una mejor comprensión de la Relatividad Especial cuyo centenario conmemoramos y que con un tratamiento directo exclusivo, después de cien años, sería tarea incompleta.

Con la voz *horizonte* designo tanto las ideas explícitas en los trabajos referidos como los trasfondos implícitos; las unas sugirieron nuevos caminos a la reflexión filosófica y a las concepciones físicas, los otros fueron transpareciendo progresivamente al avanzar el siglo xx. Unas y otros abrieron nuevos *horizontes* en el conocimiento de la Naturaleza, del Cosmos, de la Realidad. Se exhiben a continuación de modo sintético (21).

2.2.1. Horizontes abiertos *por la Relatividad restringida o especial (1905-1908)*

A) La tarea de Einstein (1905)

A los efectos de nuestro principal interés actual, la revolución más descarada que introduce Einstein aquí (aunque podríamos decir, subrepticamente, suavemente) es la idea de la primacía de lo fenoménico, de la *dinamicidad*, sobre lo material constituido, cuestión que queda escondida bajo el manto del conjunto del nuevo concepto de simultaneidad y de sus dos postulados. Sugiero que se exprese como:

Horizonte 1: El fenómeno precede a la materia.

Pero son otras muchas las revoluciones intelectuales que abrirán otros horizontes:

Horizonte 2: La necesaria sustitución del «tiempo absoluto» por un «tiempo propio» de cada evento.

Horizonte 3: Invariancia de las leyes respecto a sistemas en movimiento rectilíneo uniforme, que alumbra una relatividad esencial (de momento restringida) de la Naturaleza (que se generalizaría en la Relatividad General, en 1915).

Horizonte 4: La luz condiciona (casi es determinante de) el (funcionamiento del) Cosmos.

Horizonte 5: La masa inercial (o cantidad de materia) pierde su condición de magnitud intrínseca para ser respectiva, dado que depende de la velocidad del cuerpo.

Horizonte 6: La masa inercial (o cantidad de materia) de un cuerpo depende de su contenido de energía.

B) La tarea complementaria de Minkowski (1908)

Newton había considerado al espacio como «absoluto, verdadero y matemático». En su formalización matemática estas condiciones se expresan mediante el tensor métrico fundamental del espacio puntual euclídeo tridimensional que expresa la métrica elemental respecto de un sistema de coordenadas cartesianas triortonormales (que existen en el espacio «absoluto» de Newton). Y manifiesta su naturaleza de ser «idéntico en todas partes siempre».

La concepción einsteiniana de 1905 se había limitado propiamente al movimiento y tenido en cuenta, de hecho, sólo las métricas asociadas a las longitudes y a las duraciones tal como he puntualizado previamente; es decir, en realidad no habían afectado a las concepciones del espacio y del tiempo como referenciales. Minkowski considera estas modificaciones métricas de las longitudes y las duraciones afectando a los *referenciales* espacio y tiempo newtonianos que quedan ahora asociados en un nuevo referencial único que denomina «Mundo absoluto», espacio pseudoeuclídeo tetradimensional.

Este «mundo absoluto» (geometría), distinto al newtoniano en dimensión (4 en vez de 3) y carácter (pseudoeuclídeo y no euclídeo) es, sin embargo, también «idéntico en todas partes siempre», y en él se desarrolla, según Minkowski, la Física (existencia de cuerpos y fenómenos en/entre ellos).

Así:

Horizonte 7: Espacio y tiempo no son independientes, son subespacios ortogonales integrados en un espacio único tetradimensional pseudoeuclídeo de modo que sus métricas son respectivas.

Con este enfoque, estímulo y luz, se le abrirían a Einstein las puertas para la construcción de la Relatividad General.

2.2.2. Horizontes abiertos *por la Relatividad General (1915)*

Horizonte 8: Invariancia de las leyes respecto a cualesquiera sistemas de referencia (relatividad general de la Naturaleza).

Horizonte 9: Gravitación e inercia son fenómenos de idéntica naturaleza.

Horizonte 10: Supresión definitiva del carácter «fundamental» de las «categorías fundamentales» tradicionales de espacio, tiempo y materia.

Horizonte 11: Supresión de las acciones (gravitacionales) a distancia.

Horizonte 12: El Cosmos es finito.

Y, finalmente, quizá el más importante:

*Horizonte 13: El Cosmos se presenta como «**un único TODO total**» en funcionamiento (fenoménico) general.*

Pero esta *dinamicidad intrínseca*, inherente a su formalización, la camufla inicialmente Einstein modificando artificialmente sus ecuaciones para imponer una estaticidad general. Sin embargo esta dinamicidad está ya, implícitamente, en plenitud.

Algunas consecuencias de interés relevante pueden expresarse con otras palabras tales como las siguientes.

Primera. «La luz pesa» (geodésicas del espacio-tiempo).

Segunda. La estructuración del *Universo como conjunción espacio-tiempo-materia*. Unidad métrica y referencial y con la materia.

Tercera. *Respectividad* mutua de los conceptos de espacio, tiempo y materia que han dejado de ser entidades fundamentales (últimas, radicales, simples, primordiales, irreductibles, independientes) para ser respectivas.

2.3. Notas complementarias

Por otra parte, conviene recordar que la relatividad mantiene, desde los puntos de vista filosófico y matemático que aquí consi-

deramos, la permanencia de otros *trasfondos*, quizá los más determinantes, comunes con los de la Física Clásica, que suponen la vigencia de unos *horizontes formales*, en los ámbitos filosófico y matemático, perfectamente concatenados, y ello para las dos Teorías de la Relatividad —la Restringida y la General—, y que pueden caracterizarse, en síntesis apretada, de la manera siguiente:

Trasfondo 1: Continuidad (ámbito filosófico): expresada (ámbito matemático) mediante magnitudes físicas que se representan por variables continuas reales o funciones continuas reales de variable(s) real(es).

Trasfondo 2: Determinismo causal en los fenómenos naturales (ámbito filosófico): expresado (ámbito matemático) mediante leyes físicas relacionales de proporcionalidad (efecto-causa) generalizada.

Por esto las Teorías de la Relatividad, a pesar de sus impresionantes aportes revolucionarios: a) no han alcanzado plenamente la categoría de «nueva física» (con la que sí se considera de ordinario a la Física Cuántica); y b) con cierta frecuencia se las considera también «clásicas».

3. IDEAS FUNDAMENTALES PARA LAS CIENCIAS FARMACÉUTICAS

Los *horizontes abiertos por las Teorías de la Relatividad* han sido numerosos, las *revoluciones intelectuales* causantes de aquéllos han modificado radicalmente el pensamiento científico y filosófico en el siglo xx. De todos ellos y de todas ellas, ¿cuáles alcanzan a las ciencias farmacéuticas? Podría afirmarse, antes de concretar, que los —o las— más generales, los —o las— más radicales.

Cuatro son las ideas fundamentales que creo pueden destacarse del pensamiento de Einstein que **trascienden de la física a todo el pensamiento científico y filosófico**, y que, en consecuencia, **cubren también las ciencias farmacéuticas**. Son las siguientes: *estructura, respectividad, dinamicidad y emergencia*.

Estas ideas (¡las ideas conceptuales o filosóficas!... no sus concreciones científicas que constituyen problemas diferentes) fueron ru-

bricadas posteriormente por la Física Cuántica. (Dejo al margen las ideas que ésta introduce independientemente —distintas— de las Teorías de la Relatividad). Es decir, son ideas aportadas, en primer lugar, por la Relatividad y después por las sucesivas «nuevas físicas» (Atómica, Nuclear y de Partículas Elementales o Altas Energías), que han quedado *establecidas*, ¿definitivamente?, para todas las ciencias de la Naturaleza y para todo el pensamiento científico y filosófico.

3.1. Idea de *estructura*

El **Universo de Einstein** —a la luz de la concepción de las «categorías fundamentales» dominantes en el pensamiento occidental desde Aristóteles, pasando especialmente por Newton, hasta Einstein— no es el conjunto de elementos disjuntos espacio-tiempo-materia; sino un **sistema estructural** caracterizado por unas **propiedades: la espacialidad, la temporeidad y la materidad**, cuestión harto diferente. El tiempo, el espacio y la materia propiamente no existen: no son entidades constitutivas *per se*, no son entidades ni últimas ni primordiales, ni tampoco independientes entre sí; son meras adjetivaciones, «notas de» o características (propiedades) del Universo. De modo que desde el punto de vista de la concepción de Einstein puede decirse que el **Universo es espacioso, el Universo es tempóreo, el Universo es matérico, el Universo es energético**, etc... (además de ser, como veremos más adelante, intrínsecamente dinámico). Y siendo propiedades no tienen prelación sobre **el sistema**, que **es lo primario**, sino que sólo son «propiedades de» el sistema, sin posibilidad de existencia física o real fuera del sistema que conjuntamente caracterizan: el Universo se presenta así como única Realidad —con mayúscula— física (realmente) existente.

El Universo de Einstein —desde la perspectiva de los astros— tampoco es un conjunto de cuerpos (noción de Newton) independientes, elementos yuxtapuestos, sometidos a unas determinadas leyes; por ejemplo, en el mundo clásico, las de la gravitación universal newtoniana. El Universo es una Realidad —insisto en el «con mayúscula»— única [más adelante veremos que en ella se suceden diferentes configuraciones cada una de las cuales continúa siendo dinámica (nace, vive, muere)]. Es una **estructura** (a continuación con palabras clási-

cas) **de entidades y propiedades** [que son cambiantes; ejemplos: periodo inicial (supuesto) de unificación de las fuerzas, luz confinada por la materia, aparición de protogalaxias, etc.].

La Física Cuántica, por una parte, como marco teórico, y los descubrimientos observacionales, por otra, han ido confirmando y ampliando esta perspectiva estructural, han ido enseñando también, y quizá con más claridad, que toda *realidad* —ahora con minúscula— es un sistema estructurado.

Pues bien, tanto en Química como en Biología Celular, Genética, Biología Molecular, Bioquímica, Genómica o Proteómica, desde esta visión estructural preexistente se ha ido confirmando que el punto de vista establecido en la física es generalizable a toda la ciencia. En síntesis, **todo lo existente es primaria y constitutivamente estructural**, o si se quiere más brutalmente **no existe nada en la Naturaleza que sea simple, homogéneo o uniforme**. El ser estructura de «propiedades de la estructura», supone que el *sistema* estructural es lo primario; no es lo que primeramente se puede comprender como estar compuesto de otros elementos, ya que propiamente no existen estos otros elementos en tanto que reales integrantes del sistema.

3.2. Idea de *respectividad*

Las **consecuencias formales matemáticas** deducidas por Einstein de sus postulados pusieron de manifiesto la **respectividad**, o **interdependencia**, primero entre las métricas de espacio y tiempo (longitudes y duraciones), después entre las magnitudes masa y velocidad, a continuación entre masa y energía y, finalmente, entre todas las «categorías fundamentales» que —desde Aristóteles— integraban —a juicio de los hombres— el Universo: tiempo, espacio, materia-energía, de acuerdo con la expresión de las *ecuaciones de campo*.

El Universo de Einstein muestra que son «propiedades» tuyas las antiguas «categorías fundamentales» de espacio, tiempo y materia-energía que no son existencias independientes sino que son precisamente «propiedades de» el Universo. Además, no sólo no son independientes sino que ni siquiera son independizables *realmente*

(aunque lo fueran intelectualmente: filosófica y matemáticamente) ya que son interdependientes, son mutuamente respectivas. La realidad muestra que las «propiedades» son «propiedades de» el sistema, cuya unitariedad precede lógica y constitutivamente a las propiedades.

Las nuevas físicas fueron acumulando sabiduría de la misma naturaleza, de modo que toda realidad se concibe como un sistema de notas mutuamente respectivas, en todas las escalas, en todos los ámbitos de realidad.

3.3. Idea de *dinamicidad*

El Universo de Einstein, como todo su pensamiento, está dominado implícita y a veces explícitamente por la idea de que el *acae-cimiento* (movimiento, proceso, transformación...) precede a la *cosa* (cuerpo, sistema, objeto...).

La aportación del físico alemán que he considerado primordial ha sido la inversión de los términos del presupuesto básico que ha inundado toda la historia preeinsteiniiana desde Aristóteles. La clásica concepción de que la materia precede al fenómeno ha sido sustituida por la revolucionaria de que —en el plano filosófico— **el fenómeno precede a la materia**, o bien —en los planos de las diferentes teorías físicas— de que el movimiento precede al móvil, la transformación al sistema termodinámico, etc.

El Universo ha dejado de ser tanto la yuxtaposición de las (supuestas tradicionalmente) entidades tiempo, espacio, materia, como un conjunto de objetos cósmicos que siguen unas leyes. El Universo es «**un único TODO total en funcionamiento**» (repito con reiteración poniendo énfasis especial en las aparentes aberraciones lingüísticas del «un único» y del «TODO total»). Establece Einstein la **di-namicidad de/en el Universo** como característica fundamental de su concepción que se expresa en sus *ecuaciones de campo*:

$$\underbrace{R_{ij} - \frac{1}{2}g_{ij} R}_{\text{Efecto}} = K \underbrace{T_{ij}}_{\text{Causa}}$$

manifestación de la evolución del Universo, de la estructura referencial (matemática) espacio-temporal del Cosmos como consecuencia de la cantidad de impulsión-energía (expresado todo como funciones tensoriales en un espacio riemanniano de dimensión 4).

Por primera vez en la historia de la humanidad se concibe un **Universo dinámico**, que deja de ser «lo que es»/«como es» para hacerse otro; frente al *ser*, un reiterado *no-ser*, constituido en un *alter*. En todas las cosmologías anteriores —fueren de naturaleza prioritariamente mítica, religiosa, filosófica o científica (por ejemplo, la newtoniana)— el Universo era filosóficamente estático (igual a sí mismo siempre). Bajo este presupuesto histórico el propio Einstein «falseó» sus ecuaciones, que ofrecían un Universo *dinámico*, introduciendo un término cosmológico que lo hacía *estático*; confesaría años más tarde que esto había significado el mayor error de su vida.

En resumen: el TODO real es dinámico, la **Realidad es intrínsecamente dinámica**, y en el Universo y con él todo lo real —toda realidad— es dinámico.

Esta idea de dinamicidad, ya con no tanta claridad, sería expresada también en y desde las «nuevas físicas»: primero, la Física Atómica, después la Física Nuclear y, finalmente, la Física de Partículas Elementales o de Altas Energías.

Y con ello, trascendiendo la Física, inundando la Filosofía y el pensamiento científico todo, se introduce en la Química y en la Biología: la vida, el *philum*, el genoma...

3.4. Idea de *emergencia*

El Universo que explican las *ecuaciones de campo* de Einstein sin el término cosmológico ofrece soluciones integrales que muestran que debe existir una *singularidad en el origen* como condición de contorno temporal: el Universo sería así fruto de una emergencia. Concepciones complementarias posteriores y datos observacionales invitaron a la consideración del *big bang* (gran explosión) como instante inicial (o expresión del momento creacional).

Así, **el Universo, la Realidad, es emergente**; y... emerge como estructura.

Y en él, como muestran las nuevas físicas y las ciencias biológicas, toda realidad es emergente a partir de estructuras preexistentes.

4. CONSIDERACIONES FINALES

Finalmente, considero conveniente hacer un conjunto de consideraciones como cierre y contexto complementario para una mejor expresión de las ideas que trascendiendo del plano de la Física transitan desde las Teorías de la Relatividad a todo el pensamiento científico del siglo xx, habiéndose establecido en él.

Primera. En torno a Zubiri.

- a) Lo expuesto en la Tercera Parte —las *ideas fundamentales* para las ciencias farmacéuticas— se parece bastante a lo desarrollado en la *Estructura dinámica de la realidad* de Zubiri (22). ¡Cómo voy a negarlo! He escrito, y con reiteración, que Zubiri *fundó* su metafísica en las revoluciones de la Física del siglo xx (forma suave de decir nada menos que no puso los cimientos de su filosofía en ninguna concepción filosófica preexistente o coetánea sino precisamente en las revoluciones intelectuales y observacionales —es decir, teóricas y experimentales— de la Física confirmadas y completadas con las revoluciones de la Biología). Incluso más, no he tenido ningún problema aceptando exactamente los términos lingüísticos zubirianos porque me parecen muy afortunados, aunque, naturalmente, sean posibles otros.
- b) Pero, ¡cuidado!, «parecerse bastante» es, primero, parecerse, y segundo, sólo bastante. Se parece, y sólo se parece. Veámoslo a continuación.
- c) Zubiri fue más *cuántico* que *relativista* (23). Las notas relativas a la estructura de las *cosas reales* son (más) propias de la Física Cuántica, rama que específica y directamente no dice nada acerca del Universo.
- d) No está de más recordar que Zubiri no aceptó la integración del tiempo como cuarta coordenada de un espacio-tiempo, ni que fuera respectivo con el espacio (propiamente que fueran

respectivas —interdependientes— sus métricas: longitud y duración) o con ninguna otra nota del Universo. Para Zubiri el tiempo era «modo del devenir» y también dejó escrito como manifestación clara de la no aceptación íntegra de las Teorías de la Relatividad que «el tiempo es tiempo y sólo tiempo... y no le demos más vueltas».

Segunda. Conmemoramos los cien años de la emergencia de la *Relatividad* y ésta sigue viva. Y a ella le es aplicable lo que ella ha introducido: es *dinámica* (¡cuántas miles de páginas —más bien cientos de miles— de cálculos y de reflexiones ha originado; cómo se ha ido completando, cuántas diferentes soluciones se han obtenido; cuántas predicciones se han confirmado y se han ido estableciendo); es propiamente *estructura* de postulados, magnitudes y ecuaciones formales; es *respectiva* intrínseca; y *emergente*... hace 100 años. Y en su dinamicidad dejará de ser la que es... para que surja otra teoría, supuestamente más completa y mejor explicadora de la Realidad, del Universo.

Tercera. Finalmente, celebremos a Einstein, el genio del siglo xx, pero con conciencia clara de que el camino que queda por recorrer a la ciencia es largo, larguísimo, y dificultoso. Posiblemente —para mí con seguridad— sin final.

Galileo, el fundador de la ciencia moderna, a modo de *creencia científica* dejó su mensaje: «La Naturaleza está escrita en lenguaje matemático». La *matematicidad* de la Naturaleza, de sus leyes, continúa siendo una creencia de nuestro mundo. Aún estamos muy lejos en Física, en todas sus ramas, de establecer un *proceso de matematización* que definitivamente con absoluta exactitud *matematice* la Naturaleza.

Cuarta. Einstein afirmaba, también *creencia científica*, que «Dios no juega a los dados», como expresión metafórica de su fe firme en el *determinismo*. Sin embargo, parece ser que sí, en contra de lo que creía Einstein: «Dios no sólo juega a los dados, que sí que juega, sino que además los tiene trucados» (propensualidad de las posibilidades frente a la equipotencia de los sucesos posibles); y más aún: «Dios no sólo juega a los dados, y los tiene trucados, sino que, el muy granuja, los lanza donde no podemos verlos» (agujeros negros) (24). No se cree en la Física actual en el *determinismo* de/en la Naturaleza.

En las ciencias farmacéuticas (de la Química a la Biología) estos temas aún ni siquiera se plantean; estas ciencias están, al menos de momento, muy lejos de su *matematización*, aún en la hipótesis, en consonancia con la *creencia científica* acerca de la Naturaleza, de la *matematicidad* de ésta.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (2005a): *En torno a Einstein. La teoría de la relatividad y el pensamiento español en 1923*. Écija: Real Academia de Ciencias, Bellas Artes y Buenas Letras «Luis Vélez de Guevara».
- (2) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (2005b): «Horizontes abiertos por las Teorías de la Relatividad de Einstein», en *Teorema*, XXIV/2, pp. 83-90.
 — (2005c): «Blas Cabrera y Julio Palacios: pensamientos opuestos ante la Teoría de la Relatividad». *Limbo*, n.º 21, pp. 1-6, en *Teorema*, XXIV/2.
 — (2005d): «Ortega ante la Teoría de la Relatividad». *Limbo*, n.º 22, pp. 9-21, en *Teorema*, XXIV/3.
 — (2005e): «El impacto de Einstein en el joven Zubiri (1923)». *Limbo*, n.º 22, pp. 35-40, en *Teorema*, XXIV/3.
 En colaboración con D. TRUJILLO JACINTO DEL CASTILLO las versiones españolas de EINSTEIN, A. (2005): «Sobre la electrodinámica de los cuerpos en movimiento» y «¿Depende la inercia de un cuerpo de su contenido en energía?», en *Teorema*, XXIV/2, pp. 91-124.
- (3) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (2003): Discurso de recepción, del 14-XI-2002, como Académico Correspondiente en esta RANF, de título «La Farmacia: de la Física a la Biología. La existencia de “fantasmas”». *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, 2003, 69: 479-512. De manera concreta los puntos finales números 8 y 9. En este apartado se hace una síntesis adaptada.
- (4) REOL TEJADA, J. M. (2002): «La Farmacia en la Ciencia y en la Sanidad», en *Memoria Académica del siglo XX*. Instituto de España: Madrid.
- (5) *Ibid.*
- (6) Puede verse, por ejemplo, el *Anuario 2002* de esta RANF.
- (7) Puede verse, por ejemplo, el *Anuario 2005* de esta RANF.
- (8) En esta perspectiva puede situarse el *Discurso* de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia, nota (3). Puede verse especialmente el punto número 7.
- (9) En mi condición de catedrático de Física, y dentro de este ámbito en la parcela de Fundamentos de Física, extremo pues del extremo lejano de la Biología en el panorama de las ciencias integrantes de la Farmacia, mucho agradezco el nuevo honor que se me concede hoy.
- (10) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1972): *Problemas de Análisis Tensorial*. Madrid: Copigraf.
- (11) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1983): *Estructuras Algebraicas Tensoriales*. Madrid: Alhambra.

- (12) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1981): *Problemas de Estructuras Algebraicas Tensoriales*. Madrid: Alhambra.
- (13) GONZÁLEZ DE POSADA, F. y GONZÁLEZ REDONDO, F. A. (1996): *Ensayo introductorio a CABRERA FELIPE, B. (1996): Principios fundamentales de análisis vectorial en el espacio de tres dimensiones y en el Universo de Minkowski*. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- (14) GONZÁLEZ DE POSADA, F. y GONZÁLEZ REDONDO, M. (2002): *Ensayo introductorio a CABRERA FELIPE, B. (2002): ¿Qué es la electricidad?* Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- (15) CABRERA FELIPE, B. (1999): *Principio de relatividad*. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- (16) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1995): *Blas Cabrera ante Einstein y la Relatividad*. Madrid: Amigos de la Cultura Científica.
- (17) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (1994): *Cosmología: Física, Filosofía, Religión*. Tenerife: Universidad de La Laguna.
- (18) Ciclo de cinco conferencias de título «La Física del siglo xx en la filosofía de Ortega» en el Instituto de España en 1999. Está grabado.
- (19) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (2001): *La Física del siglo XX en la Metafísica de Zubiri*. Madrid: Instituto de España.
- (20) GONZÁLEZ DE POSADA, F. (2002): «Las revoluciones conceptuales acerca de la Naturaleza impuestas por la Física del siglo xx», en *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, CXIX, 1.º, pp. 21-39.
- (21) Con cierta extensión están desarrollados especialmente en las referencias de las notas (1), (19) y (20).
- (22) ZUBIRI, X. (1989): *Estructura dinámica de la realidad*. Madrid: Alianza.
- (23) ZUBIRI, X. (1935): Traducción de SCHRÖDINGER, E. (1935): *Mecánica Ondulatoria*. Universidad Internacional de Verano de Santander.
— (1944): «La idea de Naturaleza. La nueva física», en *Naturaleza, Historia, Dios*. Madrid: Alianza.
— (1962): *Sobre la esencia*. Madrid: Alianza.
- (24) Entrecomillados los títulos metafóricos de tres de los capítulos en que organizo con frecuencia la *Cosmología del Siglo XX* en sus relaciones con el concepto de Dios.

Derechos de los animales *versus* Investigación Biológica *

Recibido el 7 de noviembre de 2005

JOSÉ A. CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Desde el Neolítico, el hombre ha utilizado animales domésticos de algunas especies de mamíferos para importantes tareas como el transporte, etc. Además, se ha servido de ellos (y continúa haciéndolo) como «reactivo biológico», dada su insuperada sensibilidad para detectar la presencia oculta de seres vivos después de catástrofes (hundimientos de edificios por terremotos, etc.) o drogas en controles aduaneros, etc.

Su uso para ensayos de investigación biológica, en especial la relativa a la fabricación de medicamentos, plantea problemas no sólo de índole científica, en cuanto a su idoneidad, sino otros de tipo ético.

Los Profesores Giráldez y Alonso Peña (cuyas biografías se indican brevemente) abordan estas cuestiones, centrándose en facetas como las siguientes: ¿Qué se puede y qué no se puede hacer con los animales empleados para ensayos de investigación biológica o farmacéutica? ¿Qué se debe y qué no se debe hacer para estos fines?

Palabras clave: Uso de animales.—Investigación biológica y de medicamentos.—Aspectos éticos.

* Extracto de lo expuesto en la Tertulia Científica celebrada en esta Real Academia de Farmacia en la sesión del 20 de octubre de 2005, actuando como moderador el Académico de Número Don José A. Cabezas Fernández del Campo, y como ponentes Don Alberto Giráldez Dávila (Académico de Número de esta Corporación), y Don José Ramón Alonso Peña (Decano de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca).

ABSTRACT

The Rights of Animals versus Biological Research

Since Neolithic period, humans have used domesticated animals of certain mammalian species for work in transportation, etc. Furthermore, certain trained animals are very useful as «biological reagents» for searching for hidden persons after earthquakes, the detection of chemical substances in customs controls, etc.

Their use for assays in biological research, especially that related to the manufacture of pharmaceutical products, has certain problems not only as regards the suitability of the animals for such purposes but also others, derived from the ethical point of view.

Professors Giráldez and Alonso Peña (whose biographies are summarized here) analyze these topics with the following approaches: What is it possible and what is it not possible to do with animals in assays for biological and pharmaceutical research? What should and should not be done with such animals for these ends?

Key words: Animals: their use for biological research.—Animals: their use for pharmaceutical assays.—Ethical problems.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que el hombre viene empleando, ya desde el Neolítico, animales de varias especies de mamíferos, por él domesticados, para tareas como la del transporte; y esto sigue siendo de utilidad incluso en nuestros días, aunque obviamente con mucha menor intensidad en los países civilizados.

También continúa siendo importantísima la colaboración que prestan animales como los perros, sirviendo de guías eficaces para algunos ciegos; o para detectar la presencia de seres humanos ocultos en ruinas producidas por terremotos, etc., en situaciones que otras técnicas resultan ser menos eficaces. Asimismo, son estos animales amaestrados los que indican la presencia de drogas en equipajes en los aeropuertos o en los compartimentos camuflados de barcos o camiones; siendo su utilización más ventajosa que las técnicas físicas o químicas (por muy perfeccionadas que sean las actuales), dada la superioridad de lo que nuestro distinguido Académico, el Profesor Carracido, denominaba el «reactivo biológico».

Pero no es a esos valiosos aspectos del uso de animales a lo que hoy vamos a referirnos. No.

Debemos limitarnos a exponer y comentar la utilización de los animales en la investigación biológica; asunto no menos interesante.

Este amplio tema puede centrarse en lo concerniente a la investigación básica, cuestión evidentemente importante. Pero, como derivación de ella, asimismo a la investigación aplicada; o, si se prefiere, a las aplicaciones de aquella investigación fundamental. En concreto, a la utilización de los animales, ya sean domesticados o salvajes, en los ensayos que en las etapas avanzadas de la elaboración de medicamentos van a ser empleados, como prolegómenos al ensayo clínico en seres humanos.

Distintas facetas, tanto de índole científica como ética, se hallan aquí involucradas y hasta interconectadas, según es sabido.

En aras de la indispensable brevedad, dichas cuestiones podrían ser incluidas en las siguientes cuatro preguntas:

1.^a ¿Qué **se puede** hacer con los animales empleados en la investigación biológica, especialmente en la relativa a la elaboración de fármacos?

2.^a ¿Qué **no se puede** hacer para estos fines?

3.^a ¿Qué **se debe** hacer?

4.^a ¿Qué **no se debe** hacer?

Hoy, dos autoridades en la materia, con acreditada experiencia, nos van a exponer, inmediatamente, sus ideas, para que puedan éstas ser debatidas a continuación por los presentes.

Antes, distinguidos compañeros, permitidme os indique brevísimamente algunos datos de sus respectivas biografías.

RESUMEN BIOGRÁFICO DE LOS DOS PONENTES

El invitado es el Ilmo. Señor Don **José Ramón Alonso Peña**: Brillante alumno, Licenciado y Doctor de la prestigiosa Facultad de Biología de Salamanca. Catedrático de Biología Celular en dicha Universidad, ha dirigido ocho Tesis Doctorales, seis de las cuales han sido Premio Extraordinario de Doctorado. Autor de siete libros, incluyendo un manuscrito sobre la Investigación con animales y el progreso de la lucha contra la enfermedad, actualmente en edición,

tema que le preocupa, en el que ha participado en coloquios, mesas redondas y congresos. Ha publicado más de 115 artículos en revistas internacionales del ámbito biosanitario. Ha sido investigador en las Universidades de Frankfurt y Kiel en Alemania, de Friburgo en Suiza, en la Universidad de California, Davis, y en el Instituto Salk de La Jolla, Estados Unidos. Premio «Junta de Castilla y León», y Premio «Colegio Oficial de Veterinarios de Valladolid» de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, con nombramiento como Académico Corresponsal. En la actualidad es Decano de la Facultad de Biología de Salamanca. Su principal relación con el mundo farmacéutico es no sólo haber sido Profesor de numerosos alumnos de la Facultad de Farmacia de Salamanca sino enamorarse mientras hacía la Tesis de una estudiante de Farmacia, Inmaculada, con la que actualmente se encuentra felizmente casado.

Al Académico de Número Excmo. Señor Don **Alberto Giráldez Dávila** le conocen muchos pero quizá no todos los presentes, e incluso algunos probablemente no recuerden algunas de las múltiples facetas de su rica biografía. De su amplio *curriculum* sólo destacaré algunos datos relacionados con el acto de hoy:

Licenciado en Farmacia por la Universidad de Barcelona, ingresó en 1951 en el prestigioso Cuerpo de Farmacia Militar, al que han pertenecido figuras como los Académicos Carracido, Lora-Tamayo, Rivas Godoy, Comenge, Roldán Guerrero, Casares López, Zugaza y Portolés (entre los fallecidos); teniendo Don Alberto como compañero de promoción al Académico Don David Martín Hernández (felizmente entre nosotros).

Destinado en 1952 el Teniente Farmacéutico Giráldez a la Farmacia Militar de Santiago de Compostela, en aquella acreditada Facultad de Farmacia realizó su Tesis Doctoral bajo la dirección de nuestro también colega Académico Don Jesús Larralde, pasando a ser Profesor Adjunto de la Cátedra de Fisiología Animal, y a desempeñar más tarde la dirección de uno de los escasos (pero prestigiosos) Colegios Mayores de aquella Universidad, ya casado con la Profesora Adjunta de Análisis Químico y Bromatología, Doctora Doña María Luisa Díaz Eimil.

Los iniciales ensayos realizados en animales por el Doctor Giráldez en su etapa de la Academia de Farmacia Militar madrileña (re-

lativos a valoraciones de vitamina B₁ en palomas, estrógenos en ratas o la prueba para el embarazo en ranas según Galli Mainini) debieron de servirle de acicate para entregarse intensamente a la utilización de animales, con otras variadas aplicaciones.

A este propósito, permitidme (antes de terminar) que recuerde la anécdota relativa a Concha, buenísima mujer que hacía la limpieza, con todo esmero, de los contiguos laboratorios de Fisiología Animal y de Bioquímica de la Facultad de Farmacia compostelana. Instalado yo en Santiago, como Catedrático de Bioquímica desde enero de 1960, un día Concha me dio a entender que si llegaba algún «rato» más tarde al laboratorio de Bioquímica era a causa de «los ratos» de Don Jesús y de Don Alberto... Me costó cierto esfuerzo deducir que Concha hablaba no de los ratos como fracción de tiempo sino de las ratas macho (ratos) que utilizaban aquellos compañeros y amigos... Pero, con sorpresa veo que la palabra rato, según el Diccionario de la Real Academia (edición de 2001), significa en su primera acepción: «ratón», y en su segunda (y última): «macho de la rata». Luego, Concha estaba usando dicho término con toda propiedad, quizá sin darse cuenta...

Resumiré las actividades ulteriores del Profesor Giráldez señalando que amplió su formación en el «Istituto Superiore di Sanità» de Roma, en el «Istituto Mario Negri» de Milán, en la Escuela Profesional de Farmacólogos bajo la dirección del Profesor Alfonso García Valdecasas, ya en su etapa de Barcelona, ciudad en la que vivió durante varios años y en cuyos Laboratorios Doctor Andreu dirigió el Departamento de Investigación de Fármacos (1965-1973); habiendo sido también fundador y presidente de la Sociedad Española de Ciencias de Animales de Laboratorio (SECAL). Después, entre 1978 y 1986, ha dirigido, ya en Madrid, el Departamento de Biología en el Instituto de Nuevos Medicamentos del Laboratorio del también compañero nuestro Doctor Abelló; y, más tarde, ha pasado a ser asesor o profesor de otros prestigiosos Laboratorios Farmacéuticos o instituciones docentes madrileños.

Finalmente, sólo voy a destacar que su discurso de ingreso como Académico Correspondiente, en 1991, en esta Corporación, se tituló: «Utilidad de las técnicas de implantes crónicos como una de las vías recomendables para disminuir la excesiva utilización de los animales en la experimentación biológica».

**Derechos de los Animales *versus*
Investigación Biológica.
Planteamiento conceptual**

Recibido el 2 de diciembre de 2005

ALBERTO GIRÁLDEZ DÁVILA*

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
Ex-Presidente de la Sociedad Española de
Ciencias de Animales de Laboratorio*

RESUMEN

La observación de la Naturaleza lleva a la conclusión de que las especies animales usan de otras especies para su conservación, mejora y supervivencia. La especie humana no es una excepción, pero gracias a su más complejo sistema nervioso central que le dota de raciocinio puede acuñar criterios nuevos en la Naturaleza, como el de Ética. Como consecuencia puede (y debe) marcarse unos límites en el uso de otras especies animales, teniendo en cuenta: a) la necesidad de la utilización, y b) el daño que se produce al animal. Tal es el caso de la Investigación Biológica, que a tal fin se ha autoimpuesto los criterios de: Reducir el consumo de animales; Refinar las técnicas para causar el menor daño; y Reemplazar las experiencias con animales, siempre que se pueda, por otras que no precisen de ellos. La legislación vigente confirma esos criterios.

Palabras clave: Derechos de los animales.—Investigación.

* Dirección de correo electrónico: agd@raf.es

SUMMARY

**Animal Rights versus Biological Research
Conceptual exposition**

Nature observation leads to the conclusion that animal species make use of other species for their own conservation, improvement and survival. Human species is not an exception. However, due to its more complex central nervous system which provides it with reasoning, it can issue new criteria in Nature such as the ethical ones. Consequently, man may (and must) establish certain limits on the use of another animal species, considering: a) the need of use and b) the harm caused to the animal. Such is the case of Biological Research which for that purpose has self-imposed the criteria of: Reducing animal use; Refining present techniques in order to cause the least harm; and Replacing animal experiments, when possible, with others not needing thereof. Current legislation confirms those criteria.

Key words: Animals Rights.—Research.

Ante el difícil problema de responder la pregunta básica: **¿La especie humana tiene algún derecho para usar a otras especies animales en la investigación biológica?** Es preciso partir de otra más primordial: **¿Pueden los humanos utilizar animales no humanos (ANH)?**

Parece que el primer paso deberá ser el observar lo que sucede en la Naturaleza y, en este caso, la respuesta es obvia:

Miles de especies animales no pueden vivir si no utilizan y consumen otras especies.

Esta simple observación está basada en la evidencia de que existen grupos de animales cuya alimentación está constituida total o parcialmente, justamente, por otros tipos de animales; valgan como ejemplo los insectívoros, carnívoros, omnívoros y parásitos. Aparte de otras formas de utilización no directamente alimenticia como la simbiosis de cangrejo ermitaño y anémona, en la que ésta es trasladada por aquél con lo que se beneficia de mayor campo para encontrar los pequeños seres de los que se nutre y el cangrejo, a su vez, se aprovecha de los remolinos que produce su acompañante para obtener también más alimentos. O bien, la simbiosis entre grandes mamíferos y aves desparasitadoras que se ubican en sus lomos. Un caso más parecido al de los humanos, aunque entre los insectos, son las especies de hormigas que pastorean rebaños de pulgones de los

que luego en el «redil» del hormiguero extraen el jugo que almacenan en ciertas glándulas, a modo de ordeño, para su propia nutrición. O el caso de felinos que aún estando saciados cazan presas para zarandearlas, seguramente, como ejercicio o entrenamiento (por ejemplo, el gato con el ratón).

La **especie humana no es una excepción** ya que, por un lado, está conformada por la evolución biológica como de alimentación omnívora, y por otra parte dadas sus limitaciones físicas —carencia de pelo corporal, lentitud, debilidad...— debe beneficiarse de otras especies para realizar funciones —cubrirse con pieles (durante la cuarta glaciación), transporte, fuerza de trabajo— que en ocasiones le han sido absolutamente necesarias para pervivir o que normalmente le facilitan la vida a fin de desenvolverse con menor desgaste.

Por lo tanto, se puede considerar que la utilización de los ANH por nuestra especie es algo establecido por la Naturaleza, a semejanza de lo que ocurre con multitud de otros órdenes de animales. Si bien, es de destacar que a diferencia de los ANH, nosotros podemos modificar no sólo nuestros hábitos, sino incluso nuestros instintos, por ejemplo, se puede vivir normalmente prescindiendo de carne, leche y huevos, aunque el diseño de nuestra especie incluye esos nutrientes en su alimentación.

Este hecho significa que los humanos pueden acuñar conceptos y realizar prácticas **distintos a la Leyes de la Naturaleza**, como es, precisamente, el concepto de **Ética** y sus derivados: el respeto a la vida, respeto a la Naturaleza, los conceptos de crueldad o de abuso..., que no existen en la Naturaleza excepto en la especie humana, donde son autoimpuestos por ésta. Tan singular hecho supone que por razones éticas debemos también autoimponernos límites a determinadas acciones. Veámoslo.

Repasemos en qué situaciones usamos de ANH: ya hemos visto que nos son necesarios en la alimentación y muy convenientes en otras ocasiones, en cambio, hay otras muchas maneras de utilización de ellos, que no son absolutamente necesarias y aún superfluas: animales de compañía, de defensa, ornamento (cisnes, pavos reales...), espectáculos (circos, cine, fiestas, riñas...), deportes (caza, pesca, carreras...), colecciones (zoos, safaris...), industriales (peletería, cosmética, materias primas...), y otras muchas.

Para adoptar criterios de autolimitación en el uso y consumo de ANH, será conveniente, por lo tanto, tener primeramente en cuenta si la utilización es necesaria o no, por un lado, pero también es imprescindible plantearse el daño que se le produce al animal. De modo que podemos deducir cuatro alternativas, en la utilización:

- 1.^a No necesaria, pero sin daño: no hay conflicto ético.
- 2.^a No necesaria, con daño: evidente conflicto ético, que llevará a la no utilización.
- 3.^a Necesaria y sin daño: no conflicto.
- 4.^a Necesaria, pero con daño: conflicto que obliga a la autolimitación.

La siguiente pregunta será: **¿en cuál de esas cuatro categorías se sitúa la Investigación Biológica?** Volvamos a buscar el paradigma que nos da la Naturaleza. En ella, la utilización de una especie por otra cumple la finalidad de la conservación de los individuos de esta última y por ende la protección y mantenimiento de la especie misma. Más aún, en las especies sociables (enjambres, rebaños, hordas, jaurías, tribus), como la humana, los individuos no viven aislados autónomamente, sino que unos se preocupan de los otros.

Tal observación, evidente, puede ayudarnos a sentar un principio que, en mi criterio, parece ser firme: el llamado *ESPECIEISMO*, consistente en que los individuos de una especie usen de otra para proteger y conservar la propia, es algo natural; está en el diseño mismo de la Naturaleza.

El caso de la **Investigación Biológica** en el área **Biomédica** tiene como objetivo indiscutible la protección o la normalización de los individuos, lo que redundará en la conservación de la especie, razón por la cual —siguiendo el criterio anterior— se le puede considerar **necesaria**; si bien, en la investigación con ANH se les produce daño (dolor, sufrimiento, muerte), por lo tanto se encuadra en la cuarta categoría, que como quedó definido precisará de la necesaria limitación impuesta por la ética. Asimismo, la **Investigación Biológica Básica, debe catalogarse de igual forma**, ya que su mismo nombre indica que constituye la base de conocimientos que sustenta la investigación aplicada a la Biomedicina. Aparte de que el

extraordinario desarrollo del sistema nervioso central de la especie humana le faculta, nada menos, para ser el único (que sepamos) espectador del Universo, lo que le supone la **necesidad** de inquirir cuanto le rodea, incluyendo el maravilloso misterio de la vida.

Es cierto que los investigadores de la vida durante muchas centurias no tuvieron en cuenta la dignidad de las otras formas de vida, por lo que trataron a los ANH como cosas inertes. Incluso, se dio el desafortunado criterio del gran pensador René Descartes, quien postuló que sólo el animal humano percibía el dolor por ser portador de un «alma», mientras el resto no eran más que simples máquinas.

De la diatriba que desató tan aberrante postulado, entre los biólogos, y más adelante la presión social de los grupos proteccionistas sensibles al abuso sobre otras formas de vida, la comunidad científica fue tomando conciencia de que debía autolimitar las formas de investigación biológica a fin de que, aunque necesaria, se realizara de la manera más ética posible.

Los principales criterios éticos que se deben tener en cuenta antes de iniciar cualquier experiencia con seres vivos son:

- Ponderar los fines de la experiencia y su necesidad.
- Tener en cuenta el grado de sensibilidad del ser viviente a utilizar.
- Mantener siempre la postura más favorable hacia dichos seres.
- Planear la forma más idónea de realización.
- Actuar, en todo ello, con la máxima responsabilidad.
- Buscar y aplicar paliativos que minimicen el daño.
- Priorizar, siempre que sea posible, la sustitución de la experiencia por otra u otras que excluyan los seres vivos.

A fin de adoptar las limitaciones necesarias en la experimentación animal, para ajustarla a los criterios éticos, el colectivo de científicos denominado *Universities Federation for Animal Welfare* (UFAW) se reunió en 1957 con ánimo de afrontar el tema; como resultado se encargó a los Doctores W. M. S. Russell y R. L. Burch que recogieran

y elaboraran las conclusiones en una publicación. Efectivamente, al cabo de dos años apareció el libro *The Principles of Humane Experimental Technique*, firmado por dichos autores, en el que se establecen una serie de normas básicas, que han venido a resumirse en lo que se conoce como regla de las tres Rs:

- Reemplazo: sustituir, siempre que se pueda, la experimentación animal por técnicas *in vitro*, audiovisuales, programas informáticos, maquetas, *in silico*.
- Reducción: del número de experiencias, de lotes de animales por experiencia y del número de ellos por lote.
- Refinamiento: de las condiciones de la experiencia para beneficiar al animal y del planteamiento de la misma, a fin de obtener mayor información, lo que permita reducir el número de experiencias.

Actualmente, en los cursos de formación que se imparten para los investigadores se incluyen sistemáticamente los temas de ética en la experimentación y de la legislación relativa a la misma. Justamente, en el mes de octubre del presente año ya ha aparecido el Real Decreto 1201/2005 (que complementa el Real Decreto 223/1988), por el que —entre otras disposiciones— se hace obligatorio el que todo proyecto que implique el uso de animales de laboratorio debe ser previamente aprobado por un Comité Ético, a semejanza de lo que se hace normalmente con los Ensayos Clínicos.

Muchos son los testimonios de investigadores a lo largo de toda la historia de la experimentación con animales no humanos, que muestran su disgusto por tener que manipular nuestros compañeros de viaje en este planeta Tierra, con quienes compartimos el singular misterio de la Vida, pero que creen justificada esa necesidad con la finalidad del cuidado y mejora de los seres humanos. Como modelo se puede tomar uno de los testimonios sin duda más autorizado:

«Toda mi vida he sido un decidido partidario de la compasión hacia los animales y he hecho lo que he podido en mis escritos para promover este deber...»

Por todo lo que he oído, me temo que en algunas partes de Europa se presta poca consideración a los sufrimientos de los

animales y, si éste es el caso, me alegraría de que en tales países se legislara en contra de la crueldad.

Por otra parte, la Fisiología no puede progresar sin experimentos en animales vivos...

Yo siempre honraré a los que hacen avanzar la noble ciencia de la Fisiología».

Charles Darwin (1809-1882)

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DESCARTES, R. (1664): *Traité de l'homme*, París.
- (2) FEIJÓ, A. (2005): *Utilização de animais na inestigação e docência: uma reflexão ética necesaria*. Porto Alegre.
- (3) FORSMAN, B. y WELIN, S. (1995): *Studies on Research Ethics*, n.º 6. Center for Research Ethics, Goteborg.
- (4) GIRÁLDEZ, A. (1991): *Utilidad de las técnicas de implantes crónicos*. Realigraf, Madrid.
- (5) GIRÁLDEZ, A. (2003): «Ética en la experimentación animal». *Bioética y Ciencias de la Salud*, Vol. 5, n.º 3, 18-26. Córdoba.
- (6) HART, L. A. (1998): *Responsible conduct with animals in research*.
- (7) KAISER, M. y WELIN, S. (1993): *Ethical Aspects of Modern Biotechnology*. Center for Research Ethics, Goteborg.
- (8) LUMLEY, P. y BENJAMIN, W. (1994): *Research: some ground rules*. Oxford University Press, Oxford.
- (9) MOSTERÍN, J. (1995): *¡Vivan los animales!* Debate, Madrid.
- (10) NIEMI, M. A. y WILSON, J. E. (1993): *Refinement and Reduction in Animal Testing*. *Scient*. Center for Animal Welfare, Bethesda.
- (11) NUFFIELD COUNCIL ON BIOETHICS (1996): *The Ethics of Xenotransplantation*. London.
- (12) PATON, W. (1984): «Man & Mouse. Animals in Medical Research». Cap. 4. *The Ethical Questions*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- (13) ROD, R. (1992): *Biology, ethics and animals*.
- (14) ROLLIN, B. E. y KESEL, M. L. (1990): *The experimental animal in biomedical Research. As survey of scientific and ethical issues for Investigators*. CRC Press, Boston.
- (15) ROSE, M. (1997): «Animal ethics committees: do we need re-examine their purpose?» En: Van Zutphen, L. F., Balls, M. *Animal Alternatives: welfare and ethics*.
- (16) RUSSELL, W. M. S. y BURCH, R. L. (1959): *The principles of humane experimental technique*. UFAW, Londres.

- (17) SMITH, J. A. y BOYD, K. M. (1991): *Lives in balance: the ethics of using animals in biomedical research*. Oxford Univ. Press.
- (18) TURFFERY, A. (1987): *Laboratory animals. An introduction for new Experiments*. John Wiley & Sons, Ewell UK.
- (19) VAN ZUTPHEN, L. F. (1993): *Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental research*. Elsevier, Amsterdam.
- (20) VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. y BEYENEN, A. C. (1999): *Principios de la ciencia del animal de laboratorio*. Ed. española, Zúñiga, J. M. SECAL. Madrid.
- (21) ZÚÑIGA, J. M.; TUR, J. A.; MILOCCO, S. N. y PIÑEIRO, R. (2001): *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Madrid.

Derechos de los Animales *versus* Investigación Biológica

Recibido el 1 de diciembre de 2005

JOSÉ RAMÓN ALONSO

Instituto de Neurociencias de Castilla y León

RESUMEN

Nuestra vida actual, nuestro desarrollo económico y la salud de nuestras familias se basan en el avance médico y sanitario posibilitado por la investigación científica. El desarrollo de vacunas y tratamientos preventivos así como el descubrimiento de nuevos fármacos y tratamientos curativos y paliativos ha permitido mejorar nuestra cantidad y calidad de vida: de hecho, la esperanza actual de vida al nacer duplica la de hace cien años. En las familias españolas, la muerte de algún hijo o hermano en la primera infancia ha pasado de ser la norma a convertirse en algo excepcional. Estas mejoras se han basado en una investigación biomédica que usa animales como sujeto de experimentación y la aplicación de estos resultados a nuestro sistema de salud. Ello no obstante, la investigación se encuentra sujeta a fuertes críticas por parte de sectores de la opinión pública y existen grupos activistas que proponen abiertamente eliminar completamente o reducir drásticamente la experimentación con animales. Algunos de estos grupos utilizan actos violentos o terroristas para defender sus postulados. El presente artículo pasa revista a algunos de estos datos y propone a la comunidad científica un papel más activo en defensa del progreso y la salud.

Palabras clave: Animales.—Experimentación.—Investigación.—Responsabilidad social.—Salud.

ABSTRACT**Animal rights versus Biological Research**

Our present life, our socioeconomic development and the healthy life of our families are founded on the medical improvements achieved by scientific research. The discovery of vaccines and preventive treatments, as well as the development of new drugs and therapeutical strategies have doubled the life expectancy in Western countries. Children mortality, that was not so long ago the rule in most Spanish families, is now something exceptional. These clear improvements are supported by biomedical research using animals as experimentation subjects. Nevertheless, animal experimentation is focus to strong criticisms from sectors of the public opinion and there are activists that try to end or to reduce drastically animal research. Some groups use violence or terrorism to support their postulates. The present article provides an overview of our current situation and advocates a more active role for the scientific community in defence of progress and health.

Key words: Animals.—Experimentation.—Health.—Research.—Social responsibility.

LA SUPERACIÓN DE UNA HISTORIA TRÁGICA

Toda la Historia de la Humanidad está marcada por el balance entre la enfermedad y la salud, entre la vida y la muerte. El progreso de nuestra especie, de las naciones e incluso de las familias, ha estado fundamentado en poder superar las amenazas y agresiones que la propia existencia deparaba, la lucha contra las enfermedades y, en general, contra la muerte. En nuestro propio entorno estaba claro cuál era el primer deseo y la primera preocupación de hombres y mujeres: «tener salud». En ese sentido, vivimos, gracias al progreso científico, en una época privilegiada. La mayor tragedia que quizá pueda asolar a una persona, la pérdida de un hijo, se ha convertido en algo excepcional en los países desarrollados. No ha sido así en la mayor parte de nuestra Historia, como nos recuerdan los registros de nacimientos y defunciones, las biografías de personas conocidas, incluso el arte, como las Totenkinderlieder de Mahler, las «canciones por los niños muertos» o nuestros propios recuerdos familiares.

Hasta bien avanzado el siglo xx, era la norma el fallecimiento de hijos o hermanos en prácticamente todas las clases sociales. En España, la mortalidad infantil en el cambio del siglo xix al xx alcanzaba

cifras alarmantes: 226 muertos menores de un año, por mil nacidos vivos, y 39 entre los de uno y cinco años, o sea, 265 por mil en menores de cinco años. En algunas instituciones, como las incluidas madrileñas, la mortalidad en el período 1881-1890 alcanzaba al 78,5% de los niños ingresados antes de cumplir un año (Navarro, 2002). Es decir, a finales del siglo XIX el programa más grave de la salud pública era una aterradora mortalidad infantil. Una cuarta parte de los niños morían en sus primeros años, de ellos, la mitad, por diarreas y bronquitis o neumonías. En 1900, la esperanza de vida en España, una potencia europea de tipo medio, era de 34,77 años.

Un ejemplo de cómo el progreso científico, la sanidad, el desarrollo de nuevos fármacos y la investigación han marcado la Historia de nuestro país puede ser valorar la situación en la llamada catástrofe del 98. La gran crisis que supone para España la Guerra de Cuba con la siega de una generación de jóvenes, la destrucción de la flota y la pérdida definitiva de las colonias de Ultramar tuvo un culpable principal distinto al normalmente señalado: el paludismo. Rico-Avello que ha estudiado la influencia del desarrollo sanitario en la Guerra de Cuba piensa que más que una derrota militar fue un desastre sanitario, pues «en la campaña cubana, con un ejército de 200.000 hombres, fueron asistidos en los hospitales 232.714 enfermos, que causaron 3.680.245 estancias hospitalarias, falleciendo 10.610». Ese mismo año (1896), el número de heridos de guerra fue de 7.270 con 363 defunciones. De hecho en los dos años siguientes la situación aún se exacerba. En octubre de 1896 se decreta la concentración de la población rural en las ciudades y pueblos por el Capitán General Valeriano Weyler y Nicolau, para evitar el apoyo de los campesinos a los insurgentes. Esta política se mantiene hasta marzo de 1898 y los resultados son terribles: De 1896 a 1897 se pasa de 2.107 fallecidos por paludismo en La Habana a 12.702, el número total de fallecimientos, principalmente por las enfermedades infecciosas, pasa de 14.624 a 46.219. En 1898, el último año de presencia de España en la isla, se registraron 21.252 defunciones en La Habana. En 1899, primero de la ocupación norteamericana, la cifra se reduce a 8.153 y el año 1901 sólo hubo 5.720. Dos factores parecen clave: el descubrimiento del papel de los mosquitos en la transmisión del paludismo, realizado en 1897 por Ross y las actuaciones higiénicas y de erradicación de mosquitos puestas a cabo por Gorgas, respon-

sable sanitario en el Cuerpo expedicionario norteamericano (Navarro, 2002)

De este modo, la Historia hubiese podido ser otra, en prácticamente cualquier época. El fallecimiento prematuro de gobernantes, artistas, científicos o unas vidas atenazadas por la enfermedad cambió y cercenó el desarrollo de la Humanidad. El enorme coste social y económico de las epidemias y enfermedades ha sido responsable de muchos de los retrocesos y estancamientos en el progreso de las naciones y lo sigue siendo en muchos países del Tercer Mundo.

LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA Y EL PROGRESO DE LA SALUD

La investigación ha permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas, de herramientas, tratamientos y fármacos para la prevención y la lucha contra la enfermedad. Desde 1900, la esperanza de vida media en los países desarrollados ha pasado, de media, de cuarenta y cinco años a setenta, un dato que es aún más llamativo si lo referimos exclusivamente a nuestro país: la esperanza de vida pasó de los treinta y cinco años en 1900, cincuenta años en 1940, sesenta y ocho en 1957 y, al día de hoy, es cercana a los ochenta años. Nadie sensato niega que ello ha sido en gran parte debido a los avances científicos y sanitarios conseguidos tras la experimentación biomédica.

La mortalidad infantil de menores de un año que a comienzos del siglo xx alcanzaba a doscientos niños de cada mil nacidos vivos, pasó a 53 en 1957, a 16 en 1972 y se ha reducido en la actualidad a cuatro y algunos de ellos son niños prematuros que pesan menos de dos kilogramos al nacer. Podemos recordar también enfermedades concretas. Desde principios del siglo xx, desaparecieron de nuestro país la peste bubónica o levantina, la fiebre amarilla y el cólera, salvo dos brotes (Vendrell en 1911 y Cuenca del Jalón en 1971). Se ha conseguido la erradicación de la viruela en 1950, del tifus exantemático y el paludismo en 1958, la rabia en 1960, la difteria en 1975, el tracoma en 1976, la poliomielitis en 1982, el sarampión en 1988... Están totalmente controlados el tétanos, la tos ferina, la rubéola, la parotiditis, la septicemia puerperal, la fiebre tifoidea y la triquinosis.

Los factores en estos cambios son múltiples: mejor educación, mejor alimentación, mejores hospitales, mejor gestión del sistema sanitario, mejor calidad de los sistemas de agua corriente y alcantarillado, pero nadie puede negar que elementos clave en estos éxitos han sido los nuevos medicamentos, tratamientos preventivos, curativos y paliativos puestos a punto gracias a la investigación biosanitaria. Las personas de nuestra generación enferman menos y superan mejor las enfermedades porque entendemos mejor nuestro organismo y los causantes de esas enfermedades y porque hemos desarrollado medios para luchar contra ellas, fundamentalmente fármacos y vacunas.

La investigación biológica nos ha proporcionado numerosos beneficios tangibles. Prácticamente todos los avances importantes de nuestra atención sanitaria se han fundamentado en la experimentación con animales. El uso de animales ha sido clave en todas las fases de este proceso: en la investigación para establecer sus fundamentos y posibilidades, en su desarrollo, para lograr su purificación, perfeccionamiento o adecuación a humanos y en sus ensayos de seguridad, para valorar su utilidad y sus riesgos.

Entre los beneficios palpables con que contamos en la actualidad, derivados de la investigación biomédica, podemos citar los siguientes:

Vacunas

- | | |
|-------------------|--------------|
| — Carbunco | — Rabia |
| — Cólera | — Rubéola |
| — Difteria | — Sarampión |
| — Fiebre amarilla | — Tétanos |
| — Hepatitis | — Tifus |
| — Gripe | — Tos ferina |
| — Meningitis | — Viruela |
| — Paperas | |

Fármacos y tratamientos

- | | |
|---------------|--------------------|
| — Analgésicos | — Inmunodepresores |
| — Anestésicos | — Insulina |

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| — Antibióticos | — Interferón |
| — Anticoagulantes | — Quimioterapia |
| — Anticonceptivos | — Sulfamidas |
| — Anticonvulsionantes | — Tranquilizantes |
| — Antidepresivos | — Transfusiones sanguíneas |
| — Antihistamínicos | — Trasplantes de riñón, hígado, |
| — Antiinflamatorios | médula ósea, corazón, pul- |
| — Antipalúdicos | món y córnea. |
| — Esteroides | |

Condiciones que ahora podemos tratar

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| — Acné | — Escarlatina |
| — Alergias y fiebre del heno | — Esquizofrenia |
| — Anemia | — Fenilcetonuria |
| — Bronquitis | — Fracturas de hueso |
| — Cataratas | — Herpes |
| — Defectos de la córnea | — Infecciones de oído |
| — Deficiencias vitamínicas | — Infecciones por clamidia |
| — Depresión | — Nacimientos prematuros |
| — Enfermedad del Rh | — Neumonía |
| — Enfermedades de dientes y
encías | — Piedras en la vesícula |
| | — Úlceras pépticas |

Enfermedades con tratamientos que prolongan la vida

- Artritis reumatoide
- Cáncer
- Diabetes
- Fibrosis cística
- Hipertensión
- Epilepsia
- Distrofia muscular
- Enfisema
- Hemofilia
- Leucemia
- SIDA

Descubrimientos importantes

- ADN
- Angiograma
- Anticuerpos monoclonales
- Bombas de oxigenación
- Caderas y articulaciones artificiales
- Catéteres cardíacos
- Electrocardiógrafo
- Electroencefalógrafo
- Escáneres para tomografía computerizada y resonancia magnética
- Máquinas de diálisis
- Marcapasos
- Mediciones de la presión sanguínea
- Microscopio electrónico
- Pulmones de acero
- Radioterapia
- Rayos X
- Sistemas de apoyo para bebés prematuros.
- Ultrasonidos
- Ropa de quirófano
- Virus y retrovirus

Algunos ejemplos concretos de la investigación con animales en relación con problemas de salud*Cáncer*

- Uno de los primeros estudios sobre la quimioterapia en el cáncer fue llevado a cabo en perros y permitió demostrar que algunos tipos de cáncer estaban causados por un agente infeccioso.
- Debido a su similitud con el cáncer de mama humano, el carcinoma mamario felino continúa siendo un modelo importante para valorar distintos tipos de terapia útiles en mujeres aquejadas por este tipo de tumor.
- Las ratas han sido el principal animal utilizado en los ensayos toxicológicos de compuestos carcinogénicos.

Cirugía del sistema digestivo

- La utilidad de la colostomía para el tratamiento del cáncer gastrointestinal se demostró en perros.
- Todos los nuevos materiales de sutura se prueban en perros.
- La utilidad de ponerse a andar pronto tras haber sufrido una operación en el tracto gastrointestinal para reducir la formación de lesiones se demostró en perros.
- Las úlceras gástricas solían necesitar cirugía y el resultado no siempre era bueno. Los fármacos actuales contra las úlceras se desarrollaron en ensayos con ratas y perros, controlan bastante bien el desarrollo de la úlcera y pueden llegar a eliminarla tras tratamientos conjuntos con antibióticos.

Diabetes

- Para la identificación de la insulina como una hormona básica en el metabolismo de los azúcares se utilizaron perros.
- Estudios con perros han llevado a importantes avances en el tratamiento de los problemas de retina y vasculares asociados con la diabetes.
- El mejor modelo para el estudio de la diabetes infantil en humanos es la rata.
- Durante más de 50 años, la insulina que ha permitido salvar millones de vidas se ha extraído del páncreas de vacas y cerdos. La inocuidad y eficacia de estas preparaciones de insulina se probaban primero en conejos y ratones.

Distrofia muscular

- Se ha desarrollado un nuevo modelo para la distrofia muscular en pollos y se está utilizando en la actualidad para comprobar posibles estrategias terapéuticas contra esta enfermedad.

Enfermedades cardiovasculares

- Las técnicas quirúrgicas para el recambio de válvulas cardíacas y segmentos de arterias de gran tamaño, usando prótesis se probaron inicialmente en perros.

- Los marcapasos fueron desarrollados y probados en perros.
- La relación entre dieta y aterosclerosis fue identificada mediante estudios en conejos.
- Los fármacos contra la hipertensión maligna, que solía ser una sentencia de muerte en un plazo menor a un año, se desarrollaron en gatos anestesiados. Hoy, el tratamiento de la hipertensión es eficaz y bastante benigno.

Enfermedades de la infancia

- Jonas Salk utilizó monos como sujetos de experimentación para desarrollar su vacuna contra la poliomielitis utilizada actualmente en muchos países.
- Las terapias para la prevención de viruela, rubéola, sarampión, paperas, y difteria fueron logradas gracias a estudios pioneros que incluían experimentación en ratones, ratas, pollos y perros.

Hemofilia

- La primera cura de una enfermedad sanguínea mediante el trasplante de médula ósea tuvo lugar en un ratón. Este experimento llevó a las técnicas actuales de trasplante medular en humanos.

Hepatitis

- La primera vacuna mundial contra la hepatitis B se consiguió en 1981 tras una investigación en distintas especies de primates.

Lesiones de la médula espinal

- Las ratas han sido utilizadas para valorar la reversión de las lesiones medulares mediante la administración de clonidina. También se están utilizando ratas en la actualidad para ver la posibilidad de paliar las lesiones de la médula mediante el trasplante de células especializadas en la guía de axones (células de la vaina del sistema olfatorio) o células madre.

Malaria

- Los posibles medicamentos contra la malaria, una enfermedad que afecta a 200 millones de personas, se evalúan principalmente en primates antes del desarrollo de ensayos en voluntarios.

SIDA

- La primera pista de que el SIDA era causado por un virus vino de investigación sobre un tipo de leucemia que afecta a gatos. El éxito conseguido con la vacuna contra la leucemia felina proporciona algunas pistas importantes a los científicos buscando una vacuna contra el sida.
- En la búsqueda de un modelo animal para el SIDA, la identificación del retrovirus de tipo D que causa un síndrome de inmunodeficiencia en simios, que recuerda en muchos aspectos al sida, fue un elemento crucial.

Sordera

- La pérdida auditiva que se produce con la edad en ratones es similar a la que se produce en personas de edad avanzada, haciendo que los ratones sean un excelente modelo experimental para este campo de investigación.
- Ensayos de seguridad usando ratones han sido claves para el establecimiento de límites en los niveles de ruido ambiental.

Trasplantes

- Los primeros trasplantes de riñón se realizaron en perros en los años 1950s. Los resultados de estas pruebas y la experiencia allí conseguida han llevado a los actuales trasplantes de hígado, corazón, pulmón y diversos órganos endocrinos en humanos.
- Los experimentos en gatos han permitido desarrollar técnicas para suturar los vasos sanguíneos que conectan al paciente con el órgano del donante para que puedan resistir la presión arterial.

- Utilizando conejos, ratas, ratones, perros y monos, se ha dado con el sistema para deprimir el sistema inmunitario del paciente y evitar en gran medida el rechazo de los trasplantes.

Virus

- La investigación sobre enfermedades virales como el herpes simple, la rabia, la encefalomiелitis y la gripe se ha llevado a cabo fundamentalmente usando ratones. La puesta a punto de ensayos diagnósticos muy sensibles para detectar la infección se llevó a cabo utilizando ratones.
- Se utilizan primates como modelos para la infección y el desarrollo del virus del sida, además de para ver la posible implicación viral en la enfermedad de Alzheimer y en otras enfermedades degenerativas.

EL PROGRESO DE LA SALUD EN LA VIDA DIARIA

Podríamos decir simplemente que la investigación científica mejora y alarga nuestras vidas, pero vamos a intentar dar unos datos concretos. Entre 1992 y 1994, la Sociedad para la Defensa de la Investigación (RDS) publicó una serie de folletos dando las cifras de pacientes beneficiados en Gran Bretaña de desarrollos surgidos de la investigación con animales. Valorando la diferencia de población, el progreso de la sanidad en estos años y la calidad de nuestro sistema de asistencia sanitaria podemos pensar en unas cifras comparables en nuestro país:

- 50.000.000 recetas de antibióticos
- 30.000.000 de recetas de antiasmáticos
- 3.000.000 de operaciones bajo anestesia local o general
- 180.000 diabéticos mantenidos vivos con insulina
- 90.000 operaciones de cataratas
- 60.000 operaciones de articulaciones
- 15.000 «Bypasses» coronarios

- 10.000 marcapasos colocados
- 6.000 válvulas cardíacas reparadas o reemplazadas
- 4.000 defectos cardíacos congénitos corregidos
- 2.500 implantes de córnea
- 2.000 trasplantes de riñón
- 400 trasplantes de corazón o de corazón y pulmón

Sin embargo, es muy posible que la opinión pública no sea consciente de los esfuerzos que han sido necesarios para conseguir estos avances de los que nos beneficiamos y cómo ese esfuerzo de los científicos ha incluido el sacrificio de animales para la investigación básica y aplicada necesaria para conseguir estos tratamientos. Los animales de laboratorio han intervenido desde que surge la idea hasta su puesta a disposición del usuario en la oficina de farmacia o el hospital.

LA INVESTIGACIÓN TAMBIÉN SIRVE A LOS ANIMALES

Existen cuatro áreas principales de actuación:

1. Manteniendo sanos a los animales de compañía

Como en las personas, la vigilancia y la prevención son las claves de una buena salud en una mascota. La investigación sobre nutrición y cría asegura que los cachorros se conviertan en animales sanos y fuertes. Los medicamentos eliminan parásitos dañinos como las dinofilarias (gusanos del corazón), lombrices, etc. Las vacunas les protegen de enfermedades mortales como la rabia, el moquillo, la leucemia felina o la hepatitis infecciosa.

2. Ayudando a los animales que enferman

Muchos de los avances de la medicina y cirugía humana se trasladan con rapidez a la medicina y cirugía veterinaria.

Por poner un ejemplo: Uno de cada diez potros nace prematuramente. En los centros de cría caballar más avanzados tienen ahora posibilidades de salir adelante, ya que hay unidades de cuidados intensivos comparables en muchos aspectos a las de los hospitales pediátricos, usadas para los niños prematuros. Los potros son admitidos junto con sus madres, reciben medicamentos, se les mantiene con respiradores y tienen vigilancia continua hasta que el riesgo ha sido superado.

Los marcapasos alargaron las vidas de cientos de perros y gatos el pasado año. El primer perro implantado con un marcapasos en 1967 fue un éxito tan rotundo que al agotarse la pila al cabo de cinco años, se le volvió a hacer un nuevo implante. Como son tan caros, los marcapasos suelen ser donados a veterinarios por las familias de personas que han fallecido y tuvieron ellas mismas necesidad del implante de un marcapasos.

3. Protegiendo a los animales de las granjas y ganaderías

Antes de que existieran las vacunas y tratamientos veterinarios verdaderamente eficaces, la única solución cuando surgía un brote de una enfermedad en una granja era eliminar a todos los animales, sanos y enfermos. No es algo tan lejano, todos recordamos lo que surgía en una explotación hace muy pocos años cuando surgía un caso de una «vaca loca». Sin embargo, los ensayos de diagnóstico puestos a punto en un tiempo récord, permitieron separar los animales que tenían priones de los que no y salvar miles de vacas y toros, así como los medios de vida de numerosas personas.

La investigación en enfermedades, cría y nutrición, protege la salud de vacas, cerdos, ovejas, y pollos, así como la de las personas. La tuberculosis ya no es una amenaza mortal para las vacas o los humanos gracias a la investigación y enfermedades terribles como el carbunco o el tétanos pueden prevenirse con vacunas.

La investigación en marcha tiene un papel clave en la lucha contra la enfermedad y el hambre en todo el mundo. La tecnología desarrollada para la erradicación mundial de la viruela humana se está aplicando a la peste de la piel (rinderpest), una plaga devasta-

dora en el ganado bovino. Dos millones de vacas y búfalos mueren cada año en los países en desarrollo, donde estos animales son la base de la alimentación, el combustible, el abono y la situación económica de las familias. Tener éxito en esta campaña de vacunación puede marcar la diferencia entre el hambre o salir adelante para cientos de miles de pequeños granjeros y sus familias en África y Asia.

4. Posibilitando un futuro mejor para la vida salvaje

Un número importante de las especies que aparecían en la lista de aquellas en peligro ha mejorado su situación gracias a los programas de conservación y de cría en cautividad. En Estados Unidos, por poner algunos ejemplos, estos programas permitieron mantener las últimas poblaciones del águila calva o el zorro rojo, hicieron que estos animales se multiplicaran y se pudieran reintroducir en la naturaleza, donde sus números se están recuperando en la actualidad. Técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro*, la inseminación artificial y el establecimiento de bancos de esperma se están usando para salvar especies como la pantera de Florida, de la que quedan menos de 50 ejemplares en la actualidad. En España, en el Centro de Fauna Sahariana de Almería se consiguió criar las gacelas dama y el argüí sahariano, ampliando sus poblaciones. Estas crías luego se han reintroducido con éxito en varios países africanos del Sahel donde habían desaparecido completamente. En la actualidad, está en marcha un programa para la cría en cautividad del lince ibérico ante el poco éxito de los programas de conservación.

UNA NUEVA RELACIÓN CON LOS ANIMALES

Vivimos un cambio cultural: En las sociedades desarrolladas como la nuestra, los animales han pasado de verse como productos agrícolas a considerarse seres «sintientes» y con sentimientos. La divisoria entre «ellos» y «nosotros» se ha vuelto difusa. Es un proceso característico de las sociedades modernas donde se ha pasado en unos pocos años de un régimen de producción y autoabastecimiento al consumo de comida industrial. Un ejemplo típico serían

los pollos que hace no tantos años eran animales que vivían en semilibertad en los alrededores de la vivienda y eran sacrificados por la propia familia para su alimentación. En una segunda fase, tras el paso a una sociedad urbana, las aves se compran muertas y desplumadas en una pollería. Finalmente, en nuestra sociedad actual, compramos normalmente la carne procesada en filetes, hamburguesas o precocinados que se adquieren en un supermercado y donde su origen animal está perfectamente difuminado.

En el cambio de la visión existen otros aspectos basados en nuestra evolución como comunidad y nuestra cambiante relación con los animales. Nuestras tradiciones y cuentos infantiles recuerdan los animales que eran peligrosos (¡el lobo!) o beneficiosos (cerditos, cabritillas...). Ahora, muchos animales han sido antropomorfizados, convertidos en caricaturas de sí mismos. Así, mientras que en el mundo se calcula que quedan 4.000 tigres en el mundo en libertad, hay más de 10.000 tigres en un solo país (EEUU) criados y mantenidos como mascotas. Además, los avances científicos nos plantean nuevas formas de relación. Pongamos algunos ejemplos disponibles al día de hoy:

- Trasplantes de riñón para perros y gatos con un coste de 10.000 dólares por unidad.
- Clonación. La clonación de la primera mascota, un gato, se realizó en diciembre de 2004. El primer perro clonado nació el año 2005. El coste estimado por las empresas que se dedican a ello es de 50.000 \$/unidad.
- Cirugía plástica y estética: reducción de mamas, eliminación de arrugas, incrustación de joyas en garras.
- Accesorios de lujo como sacos de dormir de visón, colchones y almohadas con calefacción...

En un mundo donde sigue habiendo niños que mueren por hambre, falta de agua potable o por no poder disponer de fármacos y vacunas cuyo precio es de unos céntimos de euro, gastar estas cantidades es, en mi opinión y sin ningún ánimo de demagogia, obsceno. Ello no obstante, si se ofertan esos tratamientos o accesorios, es no solo porque existe un mercado para ello, y porque existen perso-

nas dispuestas a pagar esas cantidades sino porque el estatus moral de los animales y de las personas se ha acercado.

Volviendo al campo de la experimentación científica con animales, existen personas y asociaciones que consideran que la investigación con animales debería prohibirse, a pesar de los resultados que ha obtenido en el pasado y de la necesidad que aún tenemos de atender a las personas enfermas, de las nuevas infecciones víricas (de la gripe al SIDA) a las enfermedades neurodegenerativas. Estos grupos se autodenominan de derechos de los animales (*animal rights*), un término que desgraciadamente se ha generalizado. Estos grupos incluyen un amplio rango desde los que plantean un diálogo con los científicos y un mayor control de la experimentación llevada a cabo hasta auténticos extremistas responsables de actos violentos. Algunos ejemplos recogidos de notas de prensa del 18 de octubre de 2005 en Gran Bretaña:

- Amenazas a una guardería infantil asociada a Huntingdon Life Sciences, una empresa relacionada con la investigación con animales.
- Bomba incendiaria en el domicilio de un ejecutivo de Glaxo-SmithKline.
- Artefacto explosivo en un polideportivo de la Universidad de Oxford, para protestar contra un nuevo bioterio.
- Artefacto explosivo en la casa de un intermediario financiero que había invertido en una constructora que estaba construyendo un nuevo laboratorio de investigación en primates.

El mismo día 18 de octubre de 2005 podíamos recoger otras notas de prensa que representaban el esfuerzo de la comunidad científica y su compromiso con la sociedad.

- Proyecto EuroMouse. Se dotan 200 millones de euros para disponer de ratones que reproduzcan todas las enfermedades humanas. *The Observer*.
- Bayer chequea uno de sus fármacos más prometedores, la moxifloxacinina contra la tuberculosis, lo que genera grandes esperanzas entre los especialistas. *New York Times*.

- La restauración del gen WWOX, silenciado en la mayoría de los cánceres de pulmón, hace que las células se autodestruyan. *Innovations Report PNAS*.
- Una dieta baja en carbohidratos y alta en grasa mejora llamativamente un grupo de parámetros cognitivos y de comportamiento en un modelo murino de Alzheimer. *Health Day News*.

Los grupos en contra de la experimentación biomédica tienen un rango de estrategias que van desde la presión propagandística hasta auténticos actos terroristas. Un anuncio reciente publicado en *New Scientist*, en el que buscaban un coordinador, señalaba su estrategia de actuación: Buscamos dinero. Realizamos investigaciones ocultas. Queremos apoyo de celebridades. Desarrollamos campañas en los medios de comunicación. Necesitamos relaciones con empresas. Editamos materiales educativos. Llevamos a cabo actuaciones de presión y grupos de interés («Lobbying»).

Un punto clave es conseguir cambiar la legislación, donde han conseguido algunos éxitos en Estados Unidos:

- Endurecer la legislación vigente sobre crueldad con los animales.
- Reemplazar el término «dueño» o «propietario» por «guardián» en normas y leyes locales y estatales.
- Facilitar el acceso a tribunales federales eliminando requisitos previos.
- Establecer precedentes que permitan mayores multas por daños que no sean a la propiedad.
- Expandir a animales las posibilidades de las leyes antitortura.
- Posibilitar fideicomisos para mascotas.
- Promover referenda estatales (en 21 Estados hasta el momento) para limitar el uso de animales en investigación.
- Aplicar el término «persona» a algunas especies.

La comunidad científica debe responder, explicando a la sociedad los resultados de su trabajo y lo que podría significar la deten-

ción o ralentización de la investigación biomédica. Los hombres tenemos deberes para con los animales. Pero hay una diferencia entre esta preocupación por su bienestar y el atribuirles derechos constitutivos, en realidad, «derechos humanos». Usar animales para la investigación biomédica es, en mi opinión, moralmente legítimo y ha ayudado a salvar millones de vidas humanas.

Algunas de las actuaciones posibles son las siguientes:

- Fomentar la cultura científica.
- Defender la investigación en los parlamentos y los tribunales de justicia.
- Cumplir los objetivos en las 3 Rs: reducción, reemplazo y refinamiento.
- Informar a empresas y gobiernos de lo que está en juego, en términos de desarrollo económico y progreso de la sanidad.
- Usar las relaciones públicas y medios de comunicación social.
- Pedir y prestar ayuda en caso de conflictos.
- Estar orgullosos de nuestro trabajo y hacerlo saber a la sociedad.

Distintas asociaciones y grupos de científicos han propuesto normas éticas que guíen la investigación. Todas comparten una misma visión y postulados muy similares. Estos serían una serie de principios básicos:

1. La investigación, básica o aplicada, debe buscar, a corto o largo plazo, el progreso de la Humanidad, aumentar el conocimiento y mejorar la calidad de vida de personas y animales. Es nuestra principal herramienta de progreso.
2. La investigación con animales es una fuente principal de nuevos conocimientos en la ciencia biomédica y ha demostrado que es esencial para la lucha contra numerosas enfermedades del hombre y de los animales.
3. Todas las vidas son valiosas y deben protegerse, cuidarse y mantenerse, pero no tiene el mismo valor la vida de una

persona que la vida de un animal. Es lícito y ético sacrificar animales para salvar vidas humanas. Ello no obstante, el uso de animales implica obligaciones profesionales, científicas y morales. Los animales no solamente tienen un valor instrumental, tienen también un valor intrínseco, en sí mismos.

4. Los animales son seres capaces de sentir y de sufrir y tienen necesidades particulares en función de las características del individuo y de la especie. La investigación debe atender siempre esas necesidades y debe minimizar todo lo posible, utilizando todos los medios disponibles, el daño, sufrimiento, estrés o ansiedad que pueda causar a un animal. En concreto, cualquier procedimiento que cause más que un dolor ligero o momentáneo debe realizarse, si es factible, con medicamentos sedantes, analgésicos o anestésicos apropiados.
5. El diseño de una investigación debe incluir el menor número posible de animales, elegir aquellos más adecuados al estudio y con menor grado de sensibilidad neurofisiológica, valorar y utilizar en su caso los posibles métodos alternativos disponibles y utilizar las técnicas más refinadas, más sensibles y más delicadas posibles.
6. Todas las personas que intervengan en una investigación con animales deben tener los conocimientos, experiencia, formación y supervisión que aseguren el manejo correcto de los animales y disminuyan todo lo posible su ansiedad, malestar o estrés.
7. Las instalaciones donde se crían, mantienen o utilizan animales de experimentación deben estar conformes a los criterios más rigurosos de habitabilidad, comodidad, alimentación y sanidad, estar autorizadas por las autoridades competentes y tener supervisión continua por parte de veterinarios y personal de apoyo con formación y experiencia adecuadas.
8. Un aspecto básico de la investigación es la difusión adecuada de los resultados obtenidos, a ser posible a nivel mundial. Ello evitará la duplicación inútil de experimentos, permitirá controlar y mejorar los resultados y facilitará el progreso de la Ciencia.

9. Las especies en peligro de extinción no se deben utilizar para experimentación. La investigación que se realice sobre ellas deberá tener como objetivo principal la recuperación de las poblaciones de esa especie.
10. La sociedad debe proteger la investigación y a los investigadores, de cuyo trabajo se beneficia. Los legisladores deben establecer normas claras que protejan y regulen la investigación y la experimentación científica, y garanticen la seguridad de las personas, los animales y el medio ambiente. Esta normativa debe revisarse periódicamente y mantenerse actualizada. Los científicos deben imponerse los estándares más altos de calidad en su trabajo, desarrollar y promover el uso de métodos alternativos a la investigación con animales y educar e informar al público sobre el trabajo que realizan, los métodos utilizados y los objetivos perseguidos.

La Ciencia sirve a la Humanidad.

AGRADECIMIENTOS

La investigación de nuestro grupo ha sido financiada por la DGI (Ministerio de Ciencia y Tecnología) BFI 2003-03719, la Junta de Castilla y León, La Fundación MMA y la red C.I.E.N. del Ministerio de Sanidad y Consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANDERSON, D. (1993): *Ethical Issues in Biomedical Sciences: Animals in Research and Education*, ed Diana Anderson, Michael Reiss & Peter Campbell, Hobson's Publishing Institute of Biology.
- (2) DELGADO GARCÍA, G. (1999): «La salud pública en Cuba durante la guerra independentista de 1895 a 1898». *Cuaderno de Historia de la Salud Pública* 85: 20-26.
- (3) NAVARRO, R. (2002): *Historia de la Sanidad en España*. Lunweg Eds., Madrid.
- (4) O'DONOGHUE, P. N. (ed.) (1998): *The Ethics of Animal Experimentation*, European Biomedical Research Association and Federation of European Laboratory Science Associations.
- (5) PATON, W. (1993): *Man and Mouse: Animals in Medical Research*, Oxford University Press, Nueva York y Oxford.

- (6) RUDACILLE, D. (2000): *The scalpel and the butterfly. The war between animal research and animal protection*. Farrar, Straus and Giroux, Nueva York.
- (7) SCHIERMEIER, Q. (1998): «Animal rights activists turn the screw». *Nature* 396: 505.

* * *

Los Académicos Doctora Ana María Pascual-Leone Pascual, Doctor Albino García Sacristán, Doctor Gaspar González González, Doctor Miguel Fernández Braña y Doctor Antonio Martínez, en el coloquio que tuvo lugar al término de la sesión, hicieron interesantes preguntas o sugerencias que fueron contestadas por los ponentes.

Los Premios Nobel 2005 de Fisiología o Medicina y de Química

JUAN RAMÓN LACADENA CALERO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

PRESENTACIÓN

El 3 de octubre de 2005, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska concedió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, conjuntamente, a los doctores Barry J. Marshall (University of Western Australia) y J. Robin Warren (Royal Perth Hospital, Australia, hasta su jubilación en 1999), «por su descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y en la úlcera péptica».

Luchando contra el «establishment» científico, Warren y Marshall demostraron que la gastritis y la úlcera gastroduodenal estaban causadas en muchos casos por una infección bacteriana. Primero fue el Doctor Warren, patólogo, quien descubrió la presencia de una bacteria curvada en un 50% de los pacientes con inflamación estomacal. Posteriormente, el Doctor Marshall, clínico, se unió a él y, tras analizar un centenar de biopsias de pacientes afectados de inflamación gástrica o úlcera gastroduodenal, llegaron a proponer que la bacteria *Helicobacter pylori* estaba implicada en la etiología de dichas enfermedades. Como dijo en su momento la nota de prensa del Instituto Karolinska, la tenacidad y la mente preparada de ambos investigadores pudieron hacer frente a los dogmas predominantes utilizando técnicas poco sofisticadas.

Por su parte, el 5 de octubre de 2005, la Real Academia de Ciencias de Suecia decidió otorgar el Premio Nobel en Química, conjunta-

mente, a los doctores Yves Chauvin (Institut Français du Pétrole), Robert H. Grubbs (California Institute of Technology, Caltech) y Richard R. Schrock (Massachusetts Institute of Technology, MIT), «por el desarrollo del método de la metátesis en la síntesis orgánica».

Como decía la nota de prensa de la Real Academia de Ciencias para notificar al mundo la concesión del Premio Nobel de Química, la metátesis es algo así como un baile de «cambio de pareja» que ha resultado ser una de las más importantes reacciones dentro de la Química Orgánica, permitiendo la obtención de muchas nuevas moléculas, entre ellas fármacos. En 1971, el Doctor Chauvin fue capaz de explicar detalladamente cómo funciona la reacción de metátesis, mientras que el Doctor Schrock obtuvo en 1990 un eficaz agente catalítico metálico y dos años más tarde, en 1992, el Doctor Grubbs desarrolló un agente catalítico mucho mejor, estable en el aire, de múltiples aplicaciones.

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia organizó una Sesión Científica (24 de noviembre de 2005) para glosar ambos galardones. Para ello contó con la participación del Profesor Doctor Don José María Pajares García, Catedrático de Patología Médica y Profesor Emérito de la Universidad Autónoma de Madrid, y de la Profesora Doctora Doña María del Carmen Avendaño López, Catedrática de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Académica de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Como coordinador de la sesión científica, a ellos les cedo la palabra.

Perspectiva de las reacciones de metátesis. El Premio Nobel de Química del año 2005

Recibido el 9 de diciembre de 2005

CARMEN AVENDAÑO *

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

A fin de comentar el premio Nobel de Química del año 2005, se hace un breve resumen de lo que significan las reacciones de metátesis en síntesis orgánica y en la obtención de polímeros. En particular, se hace énfasis en el relevante papel que jugaron las propuestas de Yves Chauvin para explicar su mecanismo y en el desarrollo de los carbenos metálicos hasta conseguir catalizadores eficaces en los grupos liderados por R. R. Schrock y R. H. Grubbs.

Palabras clave: Premios Nobel.—Metátesis.—Carbenos metálicos.—Polímeros.—Reacomodo.

ABSTRACT

Perspective of metathesis reactions. The Nobel Prize in Chemistry 2005

To comment the 2005 Nobel Price of Chemistry the significance of metathesis reactions in organic synthesis and polymer science is summarized here. In particular, the leading role played by the mechanistic proposals of Yves Chauvin and the development of metallic carbenes as efficient catalysts by the groups of R. R. Schrock and R. H. Grubbs is emphasized.

Key words: Nobel Price.—Metathesis.—Metalic carbenes.—Polymers.—Rearrangement.

* Dirección de correo electrónico: avendano@farm.ucm.es

INTRODUCCIÓN

El Nobel de Química del año 2005 ha premiado la descripción y el desarrollo de un proceso químico de gran utilidad tanto en la síntesis orgánica a escala de laboratorio como en sus aplicaciones industriales, entre las que se ha encuadrado como «química verde». Los laureados son, a partes iguales, el francés Yves Chauvin, que trabajó en el Instituto Francés del Petróleo, y dos estadounidenses: Robert H. Grubbs, del Instituto de Tecnología de California (*California Institute of Technology* o Caltech) y Richard R. Schrock, del Instituto de Tecnología de Massachusetts (*Massachusetts Institute of Technology* o MIT). Estas reacciones se aplican en las industrias biotecnológica, farmacéutica y alimentaria, pero también el sector de combustibles y la producción de polímeros con propiedades especiales, usan esta metodología muy frecuentemente.

Según la Fundación Nobel: «Gracias a las contribuciones de los galardonados se han desarrollado métodos de síntesis que son más eficaces porque exigen menos pasos en las reacciones y menos recursos, produciendo menos residuos, son más fáciles de usar porque utilizan catalizadores estables en el aire a temperatura y presión normales, y son más cuidadosos con el medio ambiente porque no utilizan disolventes agresivos y generan menos residuos peligrosos». Por todo ello, estas reacciones químicas son «un gran paso adelante en la química verde».

El científico francés **Yves Chauvin**, que en la actualidad tiene setenta y cinco años, logró, a principios de los años setenta, describir en detalle cómo funcionaba una reacción ya conocida y utilizada por la industria pero que nadie antes había descifrado. Era la metátesis mediada por un catalizador metálico, de enorme aplicación en la química orgánica. Unos años más tarde desarrollaron sus contribuciones los estadounidenses **Richard R. Schrock y Robert H. Grubbs**, de sesenta y sesenta y tres años, respectivamente. El primero de ellos logró en 1990 el primer catalizador metálico eficaz para la metátesis, y ha seguido desarrollando esta metodología aportando nuevos catalizadores (especialmente de molibdeno). El segundo, dos años después, comenzó el desarrollo de los catalizadores de rutenio, que están también comercializados y se utilizan frecuentemente.

En contraste con la alegría desbordada con que los premiados con el Nobel suelen recibir cada año la noticia del galardón científico más importante del mundo, los comentarios de Chauvin fueron muy discretos: «Sobre todo estoy azorado... no tengo el auténtico perfil... soy ya mayor. ¡No soy joven! Yo llevaba una vida tranquila y ahora se acabó. Me alegré más cuando hice el descubrimiento que hoy por el anuncio del premio». Grubbs, que se encontraba en Nueva Zelanda dando unas conferencias, se llevó una gran sorpresa, aunque reconoció que había muchos rumores en el mundo de la química acerca de este premio. Finalmente, Schrock, que estaba en su domicilio en Boston cuando recibió la llamada telefónica de Estocolmo, se puso tan nervioso cuando le comunicaron la decisión del comité Nobel que «no podía hablar y le latía el corazón a 200 pulsaciones por minuto».

¿Qué son las reacciones de metátesis?

Según el Diccionario de la Real Academia Española, la palabra metátesis proviene del griego *metaqesiz*; de *meta* (en otro lugar o cambio) y *qesiz* (colocación, posición), podríamos decir que se trata de una transposición. En Gramática se aplica al cambio de lugar de algún o algunos sonidos en un vocablo, como en *perlado* y *prelado*. Análogamente a lo que ocurre en una reacción de intercambio iónico, en la que se forma el par iónico más estable a partir de otros dos iniciales, en química orgánica la metátesis es una reacción reversible y catalizada en la que se produce una reorganización del enlace de una olefina y de la que resulta una redistribución de sus dos mitades de alquilideno.

En general, las olefinas intercambian grupos alrededor de los dobles enlaces en presencia de carbenos metálicos, que son catalizadores que se comercializan, en los que participan ciertos metales de transición. Según sea la naturaleza de este metal (titanio, wolframio, molibdeno o rutenio, fundamentalmente), su reactividad frente a las olefinas es distinta, así como su tolerancia a otros grupos funcionales y a agentes medioambientales.

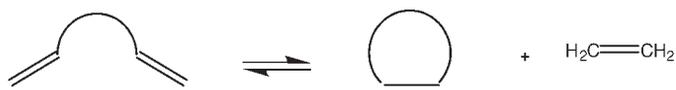
El fenómeno de redistribución de dobles enlaces puede conducir a un intercambio de grupos entre dos olefinas acíclicas o metátesis

cruzada («cross metathesis», *CM*), al cierre («ring-closing metathesis», *RCM*) o apertura («ring-opening metathesis», *ROM*) de anillos, que pueden ser grandes y, por tanto, muy difíciles de sintetizar por otros medios (1), a la polimerización de olefinas cíclicas con apertura de anillo («ring-opening metathesis polymerisation», *ROMP*), o a la polimerización por metátesis acíclica de dienos («acyclic diene metathesis polymerisation», *ADMET*) (2).

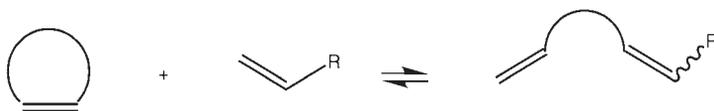
Metátesis cruzada ("cross-metathesis", *CM*)



Metátesis con cierre de anillo ("ring-closing metathesis", *RCM*)



Metátesis con apertura de anillo ("ring-opening metathesis", *ROM*)



Polimerización por metátesis con apertura de anillo
("ring-opening metathesis polymerisation", *ROMP*)



Polimerización por metátesis acíclica de dienos
"acyclic diene methathesis polymerisation", *ADMET*)

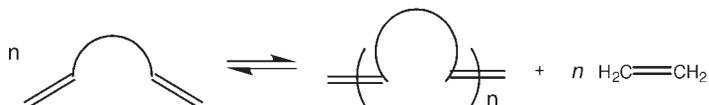
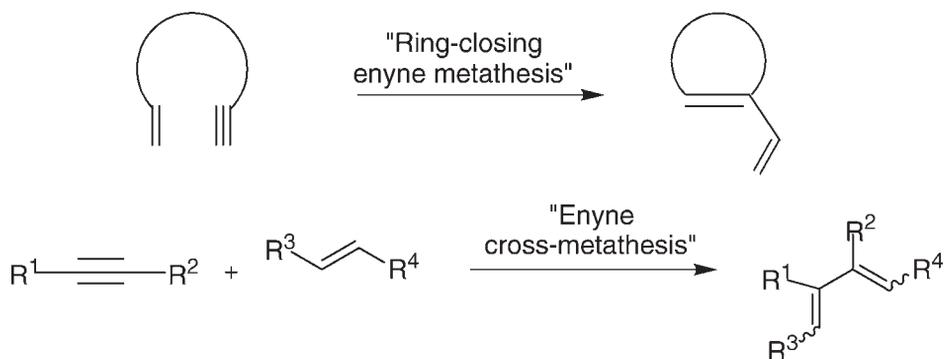


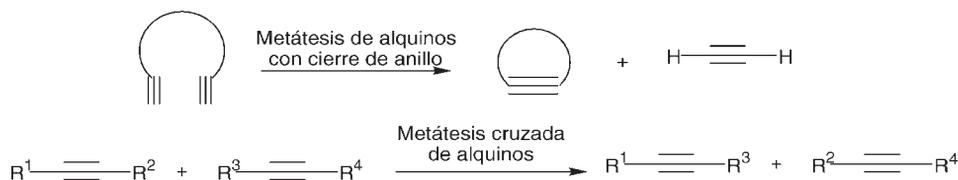
FIGURA 1. Algunos ejemplos de reacciones de metátesis

Dada su reversibilidad, estas reacciones tienen el inconveniente de que originan mezclas controladas termodinámicamente, pero pueden dirigirse para que den fundamentalmente un producto. Generalmente, la situación se resuelve practicándolas sobre un doble (o triple) enlace terminal, por la volatilidad de uno de estos productos (con frecuencia eteno), o en el caso de cicloalquenos con tensión, por la liberación de dicha tensión que origina el proceso. Existen otros medios de dirigir las reacciones y desplazar los equilibrios. Por ejemplo, en la apertura de sistemas bicíclicos (como son los derivados de norborneno) para dar sistemas cíclicos complejos, hay que evitar que se produzcan reacciones de polimerización (*ROMP*). Para ello pueden utilizarse, por ejemplo, condiciones de alta dilución o utilizar alquenos terminales muy reactivos (2). Una enorme ventaja de los procesos de metátesis radica en que los centros estereogénicos presentes en los compuestos de partida se mantienen inalterados.

Además de la metátesis de olefinas, cada vez se amplía más el tipo de sustratos de estas reacciones, siendo en los últimos años relevante el desarrollo de la reacción de metátesis de eninos, que implica la unión de un alqueno con un alquino para formar un sistema de 1,3-dieno (3). En estas reacciones, descubiertas en el grupo de Katz en 1985 y para las que se han propuestos mecanismos de cicloadición y cicloreversión [2+2] semejantes a los que comentaremos a continuación para los alquenos (4), no se pierde ningún átomo de carbono y están gobernadas por factores entálpicos, siendo el principal la estabilidad del dieno conjugado que se produce (5).



La metátesis de alquinos es análoga a la de alquenos, y en ella se intercambian unidades de alquilidino entre dos mitades de acetileno. Puede aplicarse de forma inter- o intramolecular, pero todavía no está tan desarrollada, aunque los primeros ejemplos de catálisis homogénea con estos sustratos se conocen desde 1974 (6). Estas reacciones de metátesis tienen la ventaja de que no se producen mezclas de diastereoisómeros *E/Z*, como suele ocurrir en la metátesis de alquenos (7).



Breve historia de las reacciones de metátesis

Aunque la primera observación de una metátesis de propeno a alta temperatura se realizó en 1931, el conocimiento de las reacciones de metátesis se inició cuando los investigadores de la industria del petróleo observaron en los años 1950 que las olefinas se transformaban cuando se ponían en contacto con ciertos catalizadores. En 1956, H. S. Eleuterio, del departamento de petroquímica de DuPont, constató que el propeno, en presencia de un catalizador de molibdeno sobre aluminio, originaba un copolímero de propeno-eteno, eliminándose una mezcla de gases formada por propeno, eteno y 1-buteno. En 1960, Truett publicó por primera vez una polimerización ADMET, en la que el biciclo[2.2.1]hept-2-eno producía un polímero de 2-borneno. Muchos otros químicos de otras compañías petrolíferas observaron transformaciones similares en los procesos de refinado de olefinas, que parecían cosa de magia porque no se podían explicar con los conocimientos químicos disponibles. En 1964, R. L. Banks y G. C. Bailey, de la Phillips Petroleum, publicaron la transformación del propeno en eteno y butenos, utilizando un complejo de molibdeno-hexacarbonilo $[\text{Mo}(\text{CO})_6]$ soportado sobre alúmina, y denominaron al proceso «desproporción de olefinas». En 1967, N. Calderón y otros investigadores de la Goodyear Tyre & Rubber, comprobaron que los productos inesperados se debían a que un carbono del doble enlace, junto con todo lo que a él estaba

unido, cambiaba su lugar por otro carbono del doble enlace de otra olefina con todo lo que a éste estaba unido, y denominaron por primera vez a este tipo de reacción metátesis de olefinas. Pronto se vio que la metátesis de olefinas es una transformación sintética extraordinariamente potente (8).

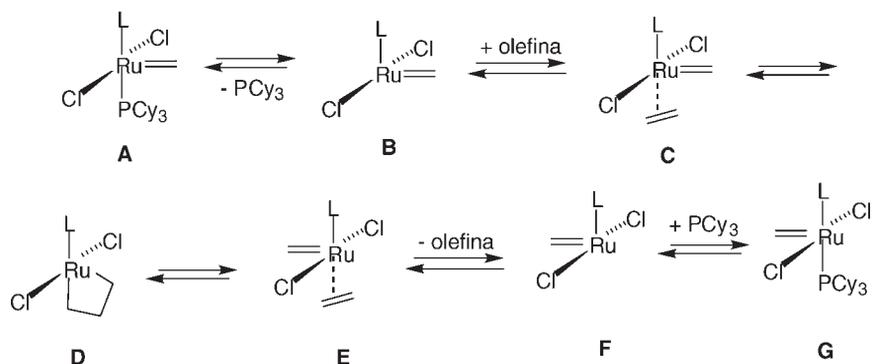
La sugerencia de que en estas reacciones intervienen carbenos metálicos se remonta a los años setenta, y se debe al primero de los laureados citados. La base de este mecanismo descansa en que el sustrato y el catalizador forman de modo reversible un intermedio de tipo metalociclobutánico. Su éxito ha sido posible gracias a la comercialización de los catalizadores que utilizan metales de transición y que se manejan en fase homogénea, en cuyo desarrollo han sido fundamentales los doctores Grubbs y Schrock.

Aportaciones más relevantes de Yves Chauvin

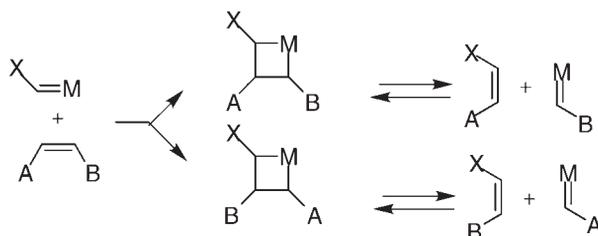
Yves Chauvin, que es Académico Correspondiente de la Sección de Química de la Academia de Ciencias del Instituto de Francia desde el 15 abril de 1996, es actualmente Director de investigación honorífico en el Instituto Francés del Petróleo, donde desarrolló su trabajo, y Director de investigación emérito en la Escuela Superior de Química Física Electrónica de Lyon (laboratorio de química organometálica de superficies, asociado al CNRS). Antes de recibir su tercio del Nobel de Química de este año, había recibido diversos premios y condecoraciones, como el premio Charles Bihoreau, de la Asociación francesa de técnicos del petróleo en 1986, el Clavel-Lespiau de la Academia de Ciencias en 1990, y la medalla Karl Engler de la Sociedad Alemana para la Investigación del Carbón y el Petróleo en 1994. Fue especialista en catálisis homogénea y en procesos de polimerización, en síntesis con organometálicos y reacciones de carbonilación, así como en síntesis asimétrica de α -aminoácidos, siendo autor de numerosos trabajos y publicaciones en estos temas. Fue también el inventor de cuatro grandes procedimientos industriales que funcionan en todo el mundo: la dimerización homogénea de eteno, de propeno o de butenos, y la dimerización selectiva de eteno para dar 1-buteno.

Diez años antes de que se hubiesen aislado los metalocarbenos (que más propiamente deberían denominarse metal-alkilidenos),

propuso el mecanismo de la metátesis de olefinas, conocido como mecanismo de Chauvin (9), que se acepta hoy día con el nombre de mecanismo de disociación *trans*, porque una olefina se coordina en *trans* respecto a un ligando secundario (L) de un metal. Los principales pasos de este mecanismo reversible implican que un ligando de fosfina se disocia del complejo inicial (**A**), en el que el metal tiene valencia + 16, para formar la especie activa (**B**), con valencia + 14. Tras la coordinación con una olefina, se forma por una cicloadición [2+2] un intermedio de metalociclobutano (**D**), que tras una ciclorreversión [2+2] se transforma en un complejo π (**E**), y éste origina otro complejo activo de valencia + 14 (**F**) y libera la nueva olefina que contiene un carbeno del catalizador y un carbeno de la olefina inicial. La especie activa **F** contiene el otro de los dos carbenos de la olefina inicial, y puede reiniciar el ciclo catalítico o ser atrapada por un ligando para dar **G**.



De esta forma, en cada ciclo se pueden formar especies de metalocarbena que resultan de la combinación del metal con cada uno de los dos carbenos de la olefina de partida.



Chauvin y Hérisson realizaron varios experimentos para comprobar este mecanismo, y en 1973 propusieron que en la transformación del 2-buteno en propeno catalizada por una mezcla de WCl_6 y $MeLi$, se producía primero la metilación del wolframio para dar WCH_3 y éste, por una eliminación α , se transformaba en el metalo-carbeno $W=CH_2$, originándose a continuación la metátesis (10).

Aportaciones más relevantes de Richard R. Schrock. Hitos en la catálisis con carbenos metálicos

Los reactivos y complejos que contienen metales de transición son protagonistas en la síntesis orgánica moderna porque permiten reacciones aparentemente imposibles utilizando los procesos basados en la reactividad de grupos funcionales. Se da la paradoja de que estos complejos deben ser suficientemente estables para ser almacenados y, por el contrario, suficientemente reactivos para ser útiles en síntesis. A este propósito, es conveniente recordar el grupo y el número de electrones de valencia de los metales, ya que para que sus complejos sean estables deben completar los electrones de la capa de valencia con ligandos que los aporten. Para que un complejo de un metal de transición sea estable (con estructura de gas noble) debe tener 18 electrones en su capa de valencia ($2s$, $6p$ y $10d$). Por ejemplo, Mo y W, que pertenecen al grupo 6 y tienen 6 electrones de valencia necesitan 12 electrones más para formar complejos completamente estables, mientras que Fe, Ru y Os, del grupo 8, Co y Rh del grupo 9, y Pd o Pt del grupo 10, tienen 8, 9 y 10 electrones de valencia, respectivamente. En general, para que un complejo metálico sea reactivo suele ser necesario que un ligando sea sustituido por el compuesto orgánico que ha de transformarse, como ya propuso Chauvin en su mecanismo de metátesis de olefinas.

La mayoría de los ligandos tienen un par de electrones no compartido que puede solaparse con un orbital dsp vacío del metal, formando un enlace σ . A este enlace se suele llamar «covalente dador». También pueden interactuar un orbital d lleno del metal y uno vacío del ligando que tenga una simetría adecuada, por ejemplo un orbital π^* , como ocurre cuando el ligando es: $C \equiv O$. Este ligando forma un enlace σ por donación del par de electrones no compartido al metal, y uno π por donación del metal al ligando. De forma seme-

jante puede entenderse el enlace metal-alquilideno de los «metalo-carbenos». Cuando un ligando insaturado se aproxima a un metal, el orbital π lleno de la olefina actúa como donador de electrones a los enlaces d vacíos del metal formando un enlace σ , mientras que los orbitales d llenos del metal se ceden a los orbitales π^* del ligando. De estas interacciones resulta un complejo π en el que el enlace metal alqueno es perpendicular al plano del doble enlace.

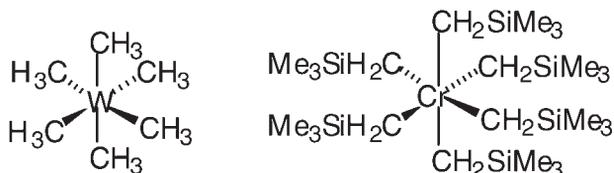
Tras la increíblemente acertada propuesta mecanística de Chauvin para explicar las reacciones de metátesis, su desarrollo fue paralelo a los avances en la catálisis con carbenos metálicos. En la época en que introdujo la implicación de un complejo de metalocarbeno para iniciar la reacción, sólo se conocían los carbenos de Fischer. En estos carbenos el átomo de carbono está estabilizado por un heteroátomo, por ejemplo el oxígeno de un grupo alcoxilo: $[L_n W=C-OR(R')]$, siendo el complejo pentacarbonil[metoxibencilideno]wolframio(0) el primero en ser descubierto en 1964. Hoy se utilizan en innumerables reacciones de acoplamiento carbono-carbono y de ciclación de carbociclos y heterociclos (11), pero en los primeros años setenta se utilizaban para la ciclopropanación de olefinas. En estas reacciones la olefina no se desproporciona, sino que el carbeno se adiciona al doble enlace para dar un ciclopropano mientras que el metal se reduce.

El desconocimiento existente acerca de los organometálicos explica que muy pocos químicos se implicaran en este tema, hasta que en 1976 se demostró que el complejo $Ph_2C=W(CO)_5$, un carbeno bien definido, podía iniciar la metátesis sin añadir ningún activante y transformar el isobuteno en 1,1'-difeniletano. De los diversos grupos que trabajaron en este sentido hay que destacar a Katz, quien realizó diversos experimentos de gran interés para apoyar el mecanismo propuesto por Chauvin (12).

Hasta mediados del siglo xx, los químicos pensaban que los compuestos de metal-alquilo eran inestables debido a la bajísima energía del enlace metal-carbono. Pero Wilkinson, que fue premio Nobel de Química en 1973, descubrió que la inestabilidad era debida a la presencia de un átomo de hidrógeno en la posición β , que se descomponía a través de una reacción de β -eliminación. Este hallazgo permitió sintetizar complejos metálicos estables al calor, siempre que los grupos alquilo careciesen de hidrógenos en β , como es el caso de metilo, neopentilo, bencilo, mesitilo o trimetilsililmetilo.

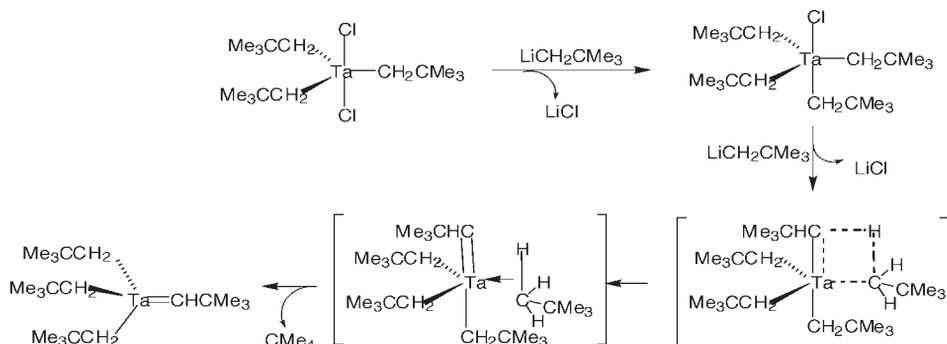


Alquil-metal inestable



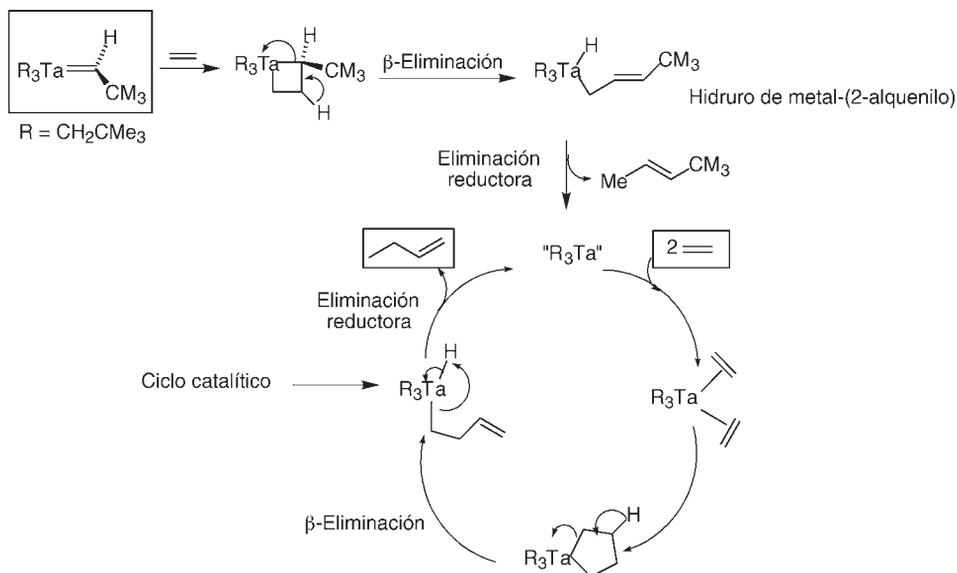
Complejos estables de un metal de transición y un alquilo carente de H en β .

Richard Schrock fue doctorando en Harvard de John Osborn, quien a su vez había sido doctorando de G. Wilkinson en el Imperial College de Londres. Por lo tanto, Schrock es «nieto científico» de Wilkinson, y no cabe duda de la influencia que había recibido en su etapa de formación. Mientras trabajaba en Du Pont, trató de sintetizar $[\text{Ta}(\text{CH}_2\text{CMe}_3)_5]$ uno de estos complejos estables con tántalo, pero no pudo. La suerte hizo que al tratar de coordinar un quinto ligando de neopentilo se produjera neopentano y, a través de una reacción de α -eliminación, el complejo $[\text{Ta}(\text{CH}_2\text{CMe})_3=(\text{CHCMe}_3)]$ (13). Éste fue el primer complejo estable de metalocarbeno (o metal-alquilideno) en el que el metal tenía un alto grado de oxidación.



Schrock preparó entonces otros complejos con alquiledenos incluido el primero con un grupo metileno: $\text{TaCp}_2(\text{CH}_3)(=\text{CH}_2)$. También incorporó diversos metales de alto grado de oxidación, como niobio o tántalo, y los caracterizó en estado cristalino por rayos X y en solución por RMN.

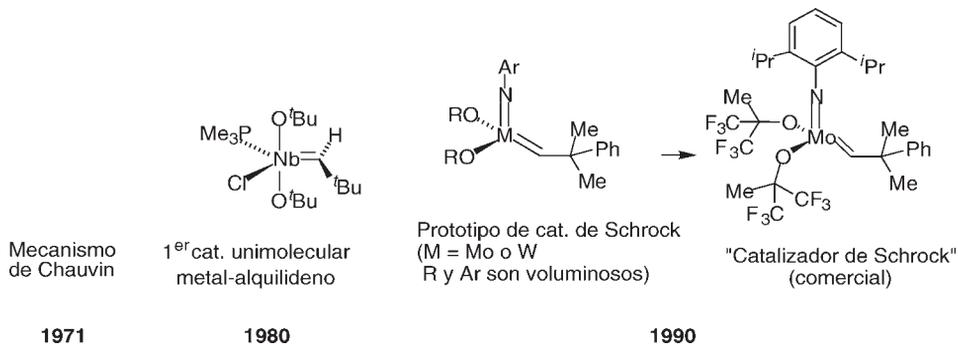
Estos descubrimientos no supusieron todavía un avance en las reacciones de metátesis de olefinas, porque ninguno de los metalocarbonos que se preparaban eran capaces de catalizarlas. Sin embargo, Schrock demostró que sí podían catalizar la dimerización de olefinas. En estas reacciones de dimerización dos moléculas de eteno, por ejemplo, se coordinan para dar un metal-ciclopentano. En este caso, a través de una β -eliminación, se origina un hidruro de metal-(3-butenilo) y éste, por eliminación reductora, se transforma en 1-buteno iniciándose un nuevo ciclo catalítico. También Chauvin había descubierto en los años 80 un catalizador de titanio muy eficaz para la dimerización de olefinas (14).



En 1980, el grupo de Schrock del MIT encontró algunos catalizadores de niobio y tántalo $[\text{M}(\text{=CH}-t\text{Bu})\text{Cl}(\text{PMe}_3)(\text{O}-t\text{Bu})_2]$ que, debido a la presencia de ligandos de tipo alcóxido, permitían la me-

tátesis del *cis*-2-penteno. Ya se ha comentado que anteriormente esta reacción había sido posible con catalizadores de wolframio de tipo $[W(CO)_5(=CPh_2)]$, pero dado que éstos se descomponen previamente, estos catalizadores de Schrock fueron la primera prueba del mecanismo de Chauvin. Para conseguirla fueron necesarios ¡casi 10 años! (15).

Puesto que molibdeno y wolframio eran los metales más activos para las reacciones de metátesis, el grupo de Schrock se empeñó desde 1980 en la búsqueda de algunos de sus complejos de alquilideno, llegando a los que poseen de fórmula general $[M(=CHCMe_2Ph)(=N-Ar)(OR_2)]$, que ya fueron estables. Cuando se publicó en 1990 el «catalizador de Schrock», se produjo el primer avance real en las reacciones de metátesis desde los catalizadores de wolframio de Katz, ya que era extraordinariamente reactivo frente a un gran número de sustratos de tipo alqueno y muy útil para crear sistemas muy impedidos estéricamente. Además, se comercializó y permitió preparar análogos quirales que se utilizaron en los primeros estudios de metátesis asimétrica (16).



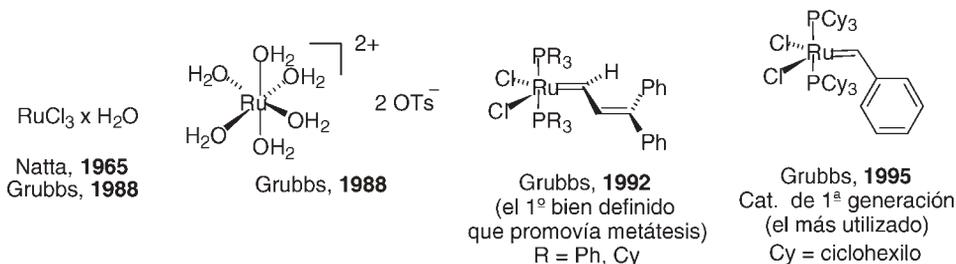
Sin embargo, como veremos más adelante, los complejos de molibdeno tiene el inconveniente de ser muy sensibles al oxígeno, a la humedad y a muchos grupos polares, debido a la deficiencia electrónica que posee el metal.

Aportaciones de Robert H. Grubbs. Catalizadores de rutenio y su historia

Los complejos de metal-alquilideno pueden clasificarse en dos grupos: los que contienen un carbeno nucleófilo, como el «catalizador de Schrock», y los que contienen un carbeno electrófilo debido a que la carga positiva del metal está aumentada por el efecto atractor de electrones de ligandos de tipo carbonilo. Entre estos últimos se encuentran los complejos de hierro, estudiados por Pettit en 1966 $[\text{FeCp}(\text{CO})_2(=\text{CH}_2)]^+$ (Cp = ciclopentadienilo) (17), y $[\text{RuCp}[\text{C}(\text{Me})\text{OMe}](\text{CO})(\text{PCy}_3)][\text{PF}_6]$, preparado en 1971 por un grupo de Oxford. El último fue el primer complejo conocido de tipo rutenio-carbeno, en el que el carbeno está estabilizado por un grupo metoxilo.

Grubbs había estado interesado durante muchos años en las reacciones de metátesis. De hecho, un año después de la propuesta de mecanismo de Chauvin, publicó un trabajo acerca de los tres modos en que podían evolucionar los complejos de metal-ciclobutano formados en la reacción de especies de metal de transición-alquilideno y una olefina (18). Influido por los trabajos de Natta en 1965 sobre la polimerización de ciclobuteno y 3-metilciclobuteno utilizando RuCl_3 como catalizador, Grubbs publicó en 1988 la polimerización del 7-oxanorborneno utilizando también como catalizador RuCl_3 . Alternativamente, utilizó para esta reacción un complejo de rutenio soluble en agua: $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{OTs})_2$ (Ts = toluenosulfonato), y pudo demostrar que durante la misma se formaba un intermedio de rutenio-alquilideno en el que la fuente de alquilideno era el diazoacetato de etilo, que se adicionaba a la solución acuosa de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{OTs})_2$ (19).

En 1992 Grubbs publicó el primer complejo de rutenio-carbeno, eficaz como catalizador en varias reacciones de metátesis que poseía una estructura bien definida (20), y tres años más tarde apareció y se comercializó el complejo $(\text{PCy}_3)_2\text{Cl}_2\text{Ru}^5\text{CHC}_6\text{H}_5$ (Cy = ciclohexilo), llamado «catalizador de Grubbs de primera generación». Todavía hoy es el más utilizado por su estabilidad al aire y su compatibilidad con una gran variedad de grupos funcionales, a excepción de las aminas y los nitrilos en medio básico. Puede usarse sin necesidad de utilizar líneas de vacío o espacios totalmente libres de humedad, mientras que estas condiciones experimentales son necesarias cuando se utiliza el «catalizador de Schrock», más reactivo.

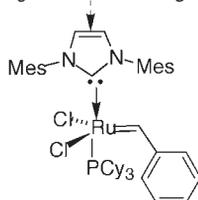


Ya que los estudios mecanísticos indicaban, desde la propuesta de Chauvin, que un ligando de fosfina del catalizador se disociaba para generar el intermedio reactivo, con un átomo de rutenio con 14 electrones, era conveniente acelerar la disociación de este ligando. Para ello se introdujeron ligandos cíclicos de bis-amino carbeno (ligandos de Arduengo) en lugar de un resto de fosfina. Los ligandos de Arduengo son dadores σ excelentes sin propiedades como aceptores π , y se obtienen fácilmente por desprotonación de los correspondientes cationes de imidazolio. Al introducir uno de estos ligandos en el catalizador de Grubbs de primera generación se aumentó la densidad electrónica del rutenio y se labilizó el enlace rutenio-fosfina, favoreciendo su disociación. Así surgió el «catalizador de Grubbs de segunda generación», que también está comercializado. Es el segundo más utilizado en la práctica general de las reacciones de metátesis y el primero en las reacciones de metátesis cruzada (21).

Hoveyda desarrolló en 1992 otro catalizador de rutenio derivado del de Grubbs de primera generación, que lleva un único ligando de fosfina y un grupo quelante en el ligando de carbeno. En 1999 sustituyó en este catalizador el ligando de fosfina por el mismo carbeno de Arduengo que posee el catalizador de Grubbs de segunda generación (22). Estos dos catalizadores de Hoveyda están también comercializados, aunque existen modificaciones que los hacen más reactivos, como ocurre cuando se introducen grupos nitro en el arilo del bencilideno. Los catalizadores de Hoveyda poseen una reactividad muy semejante a los de Grubbs de segunda generación, pero son especialmente útiles en casos difíciles, como son la metátesis de olefinas polisustituidas o las reacciones de metátesis cruzada muy selectivas, en las que hay que evitar las reacciones de homo-aclopiamiento. El catalizador de Hoveyda de segunda generación, además de reciclable por cromatografía tras la reacción, reacciona con sustratos que

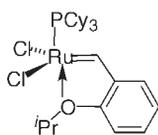
poseen una gran deficiencia electrónica (23). La variación de los catalizadores de rutenio más interesante hasta el momento es la de Blechert, en la que como consecuencia de la utilización de un derivado de naftaleno como ligando de alquilideno, se desestabiliza estéricamente el enlace Ru-O y se hace al complejo más reactivo (24).

Ligando de Arduengo

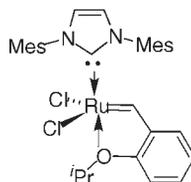


Cat. de Grubbs de 2ª generación, **1999** (el 2º más utilizado)

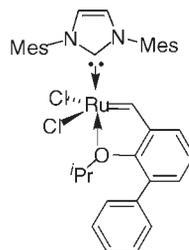
Mes = 2,4,6-trimetilfenilo



Cat. Hoveyda, **1999** de 1ª generación (comercial)



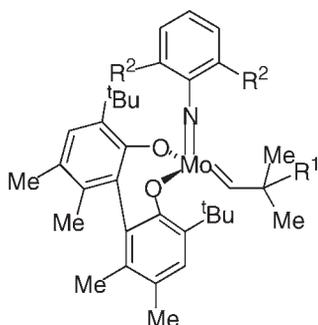
Cat. Hoveyda de 2ª generación, **1999** (comercial)



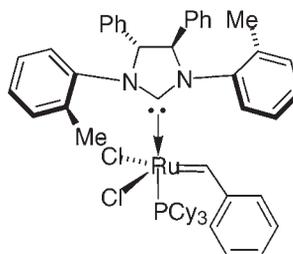
Cat. Blechert, **2002**

Metátesis enantioselectiva. Catalizadores quirales

Esta aplicación continúa siendo un desafío en la actualidad. Tras un primer ejemplo de metátesis enantioselectiva, llevado a cabo por el grupo de Schrock en 1993, éste empezó en 1997 a colaborar con el de Hoveyda. En 1998 ambos publicaron una metátesis ROMP asimétrica eficiente utilizando un catalizador de molibdeno quiral que contiene (*R*)- o (*S*)-binaftol.

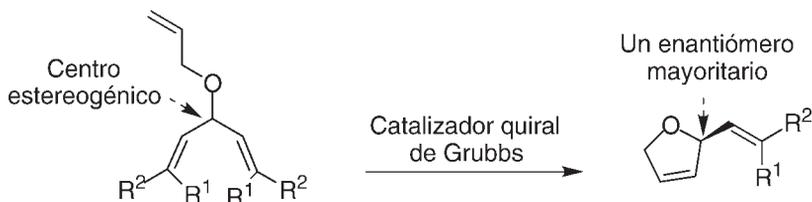


Catalizador quiral de Schrock-Hoveyda, **1998**



Catalizador quiral de Grubbs, **2001**

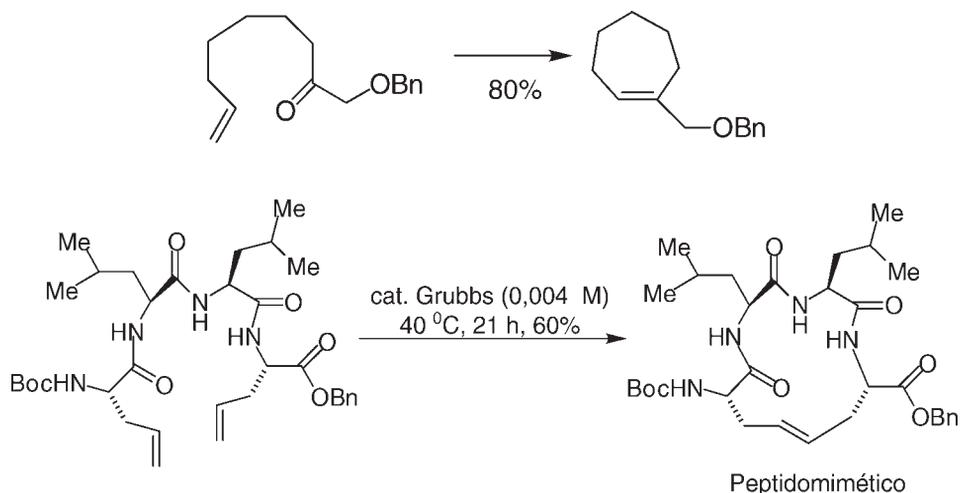
En el año 2001 Grubbs desarrolló el primer catalizador de Ru quiral, con el que pueden practicarse reacciones asimétricas como la indicada.



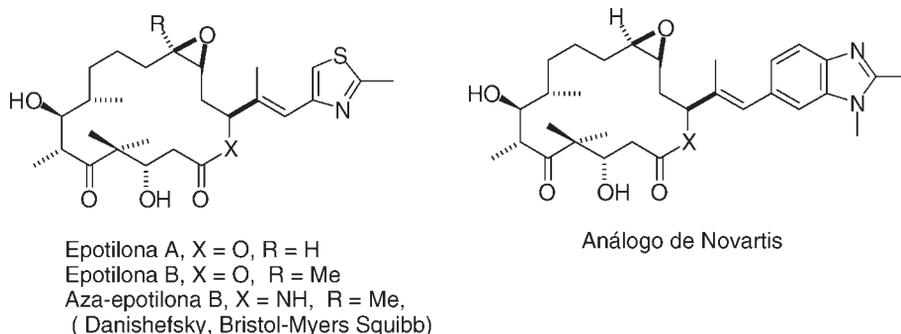
Aplicaciones sintéticas a escala de laboratorio

Junto con las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio, las reacciones de metátesis de alquenos, eninos (25) y alquinos han demostrado ser una piedra angular en las construcciones orgánicas de las últimas dos décadas y, desde la comercialización de muchos catalizadores, se han utilizado enormemente en síntesis orgánica. La más popular de todas las reacciones de metátesis entre los químicos orgánicos es la RCM de diolefinas terminales, que puede realizarse al aire usando el catalizador de Grubbs de primera generación. La más fácil de estas reacciones es la obtención de ciclopentenos y de sus análogos heterocíclicos, ya que son compuestos muy estables, pero también es relativamente fácil obtener grandes ciclos con importantes propiedades biológicas si se utilizan como precursores olefinas terminales. Cuando son necesarios otros catalizadores más reactivos, como en las reacciones de metátesis cruzada, se utilizan el de Schrock o el de Grubbs de segunda generación. Estas reacciones se han utilizado en la síntesis de productos naturales de gran interés biológico (26).

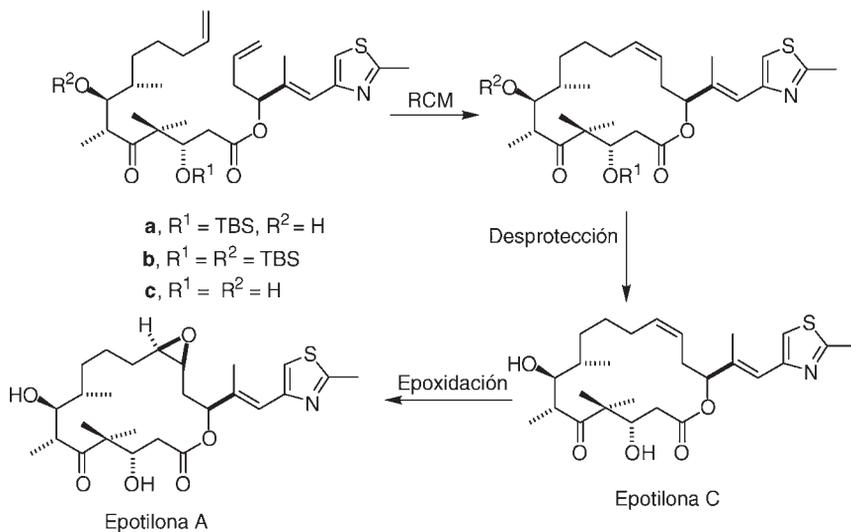
Las reacciones de metátesis puede dar lugar también a la olefinación de un grupo carbonilo, y la metátesis con cierre de anillo puede aplicarse también a la síntesis de péptidomiméticos (27).



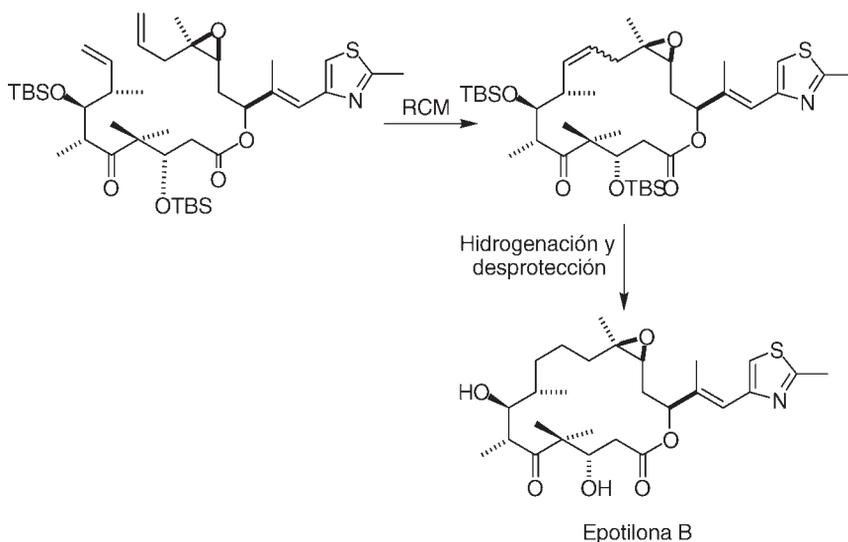
Danishefsky y Nicolaou han utilizado estas reacciones en las ya clásicas síntesis de epotilonas A y B. Estos compuestos naturales, aislados de la mixobacteria *Sorangium cellulosum*, comenzaron a mostrar notable interés cuando se demostró que poseían la misma o mayor eficacia como antitumorales que el taxol, y que actuaban con idéntico mecanismo de acción (28). Aunque se trata de moléculas relativamente pequeñas, tienen muchos grupos funcionales y varios centros estereogénicos. A finales de 1996, Danishefsky publicó la primera síntesis total de la epotilona A e, inmediatamente lo hicieron Nicolaou y otros (29). Desde entonces se han publicado alrededor de 20 nuevas síntesis para obtener ambos compuestos o sus análogos, de forma que las epotilonas han servido para demostrar la eficacia de nuevas metodologías sintéticas.



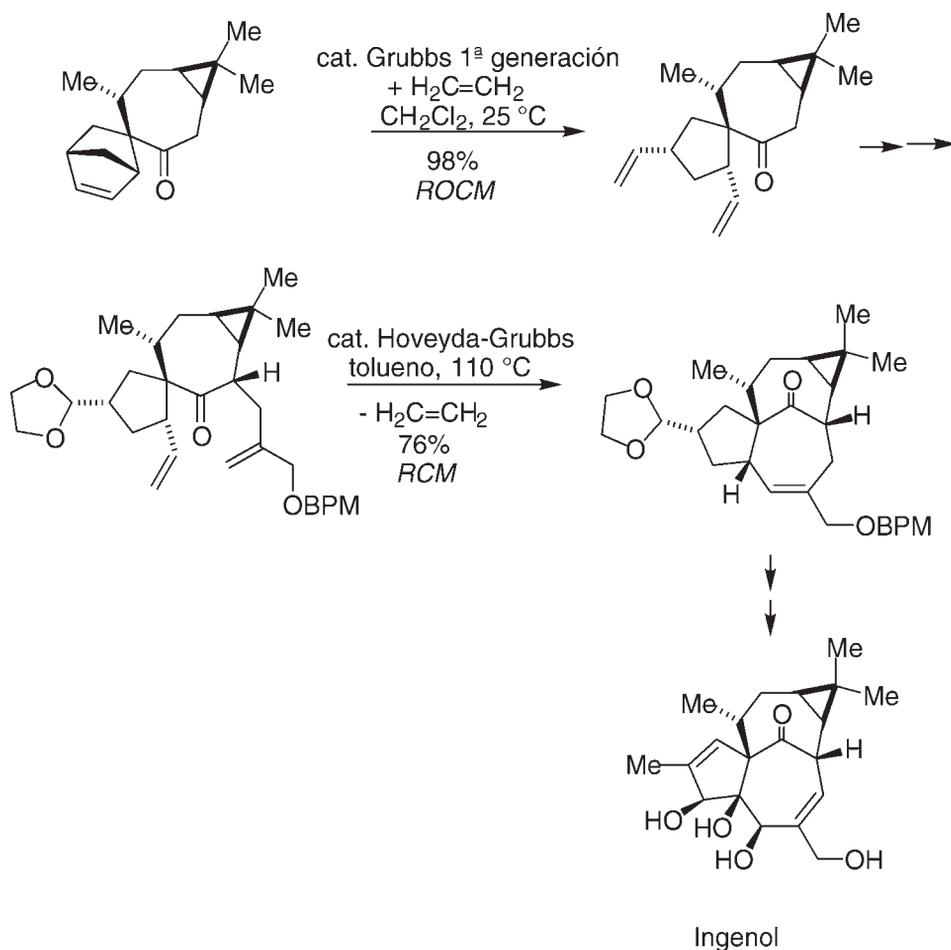
Un grupo de estas estrategias ha aplicado la metátesis de olefinas como reacción clave para la formación de dobles enlaces C-C intracíclicos. Ver, por ejemplo, la síntesis de epotilona C y su transformación en la epotilona A.



O la síntesis de epotilona B utilizando otro dieno como intermediario.

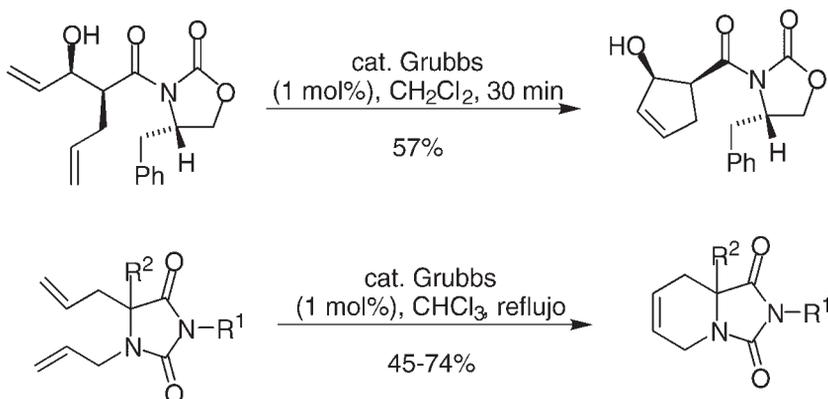


Otro ejemplo de interés es la síntesis de ingenol, un producto natural policíclico que posee muchas funciones oxigenadas y una estereoquímica *trans* en el sistema bicíclico formado por el puente de cetona. En este caso, un dieno producido casi cuantitativamente por una reacción de apertura de anillo por metátesis cruzada fue manipulado para dar otro dieno, y éste originó un precursor de ingenol muy próximo a su estructura y funcionalidad a través de otra segunda reacción de metátesis, esta vez con cierre de anillo (30).

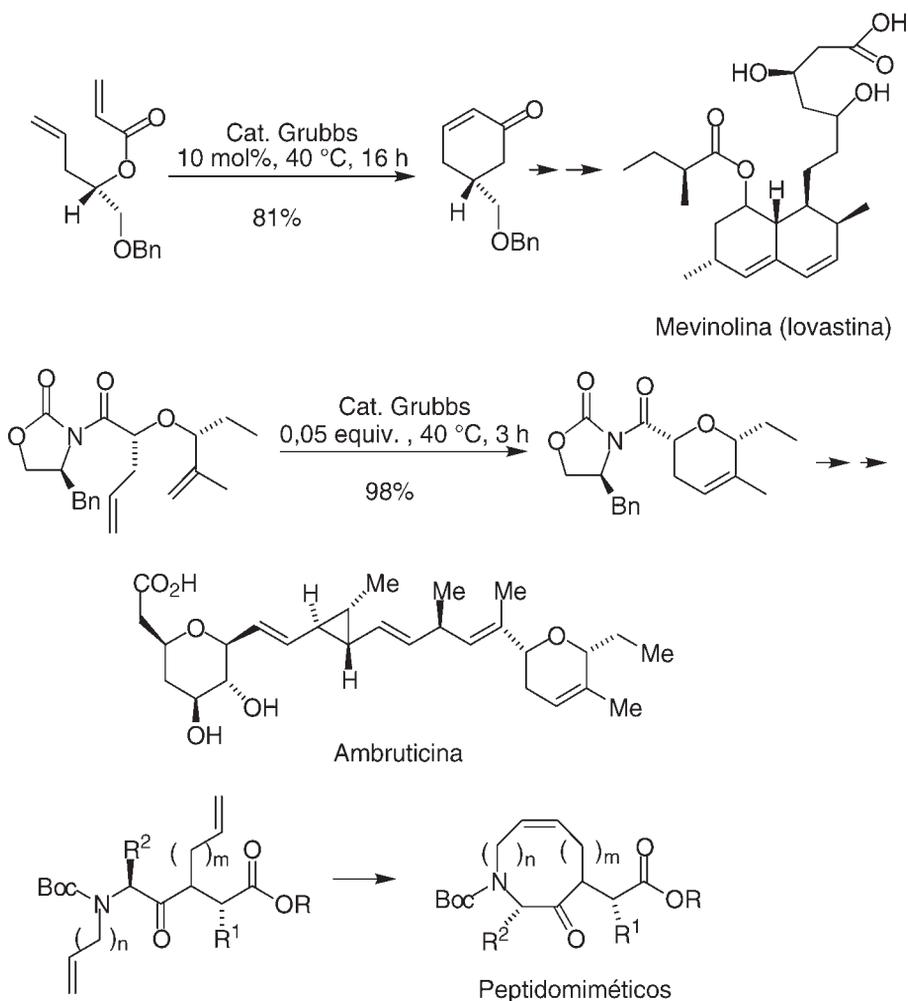


Una reacción de metátesis aplicada a la síntesis de productos muy complejos queda a veces «enterrada» en la complejidad de la estructura que acaba siendo sintetizada, aunque resulta imprescindible o muy conveniente para su acceso. Un ejemplo de este tipo lo encontramos en la síntesis de las coleofomonas B y C realizada por el grupo de Nicolaou (31).

En 1992, Grubbs comenzó a utilizar esta metodología para sintetizar heterociclos con oxígeno o nitrógeno, y posteriores trabajos de Hoveyda abrieron las puertas al uso de estas reacciones en síntesis heterocíclica y en el cierre de anillos que poseen muchas funcionalidades. Éteres lactonas, o azaciclos, dan por RCM muchos heterociclos o alcaloides de difícil acceso (32).



Dentro de sus aplicaciones farmacéuticas podemos destacar la utilización de esta reacción para la preparación de un intermedio en la síntesis total de mevinolina (un agente que rebaja los niveles de colesterol) (33) y la síntesis de ambruticina, que es un antifúngico (34). Otros varios ejemplos se relacionan con la síntesis de peptidomiméticos en los que un enlace disulfuro se ha reemplazado por una olefina obtenida por RCM (35).



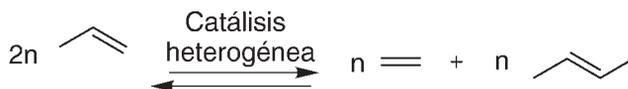
Actualmente, se abre paso su uso en síntesis asimétrica, siendo de interés las reacciones dominó o en cascada. También se aplica a la síntesis de polisacáridos por RCM y a la química combinatoria (36).

Usos industriales

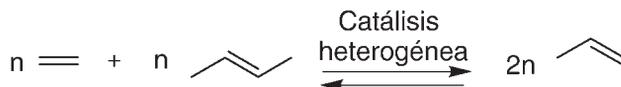
La producción industrial de olefinas se basa en reacciones de metátesis cruzada utilizando catálisis heterogénea. Desde 1966 a 1972,

Phillips Petroleum fabricó eteno y 2-buteno a partir de propeno, en un proceso denominado «Phillips triolefin process». Pero como se trata de una reacción reversible, se puede producir propeno, del que hoy existe una gran demanda, a partir de eteno y 2-buteno. Este proceso se conoce como «olefins conversion technology» (OCT) y se utiliza por varias industrias petroquímicas. 1-Hexeno y 3,3-dimetil-1-buteno se fabrican también por metátesis cruzada, y Shell Chemicals produce más de 1,2 millones de toneladas/año de olefinas lineales de alto peso molecular según el proceso «Shell Higher Olefins Process», que tiene como paso clave la metátesis cruzada.

“Phillips triolefin process”



“Olefins conversion technology”

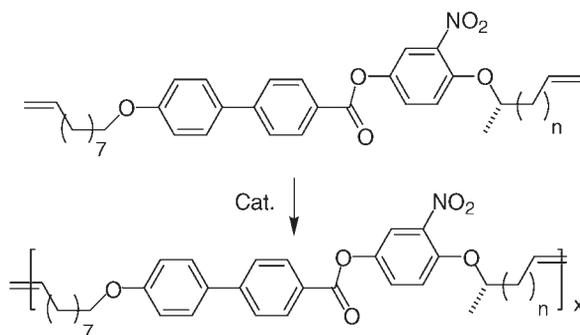
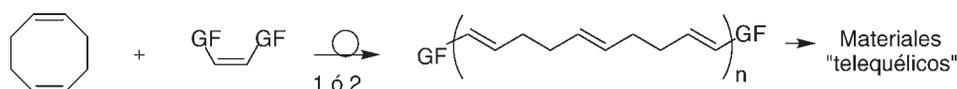


“Shell Higher Olefins Process”



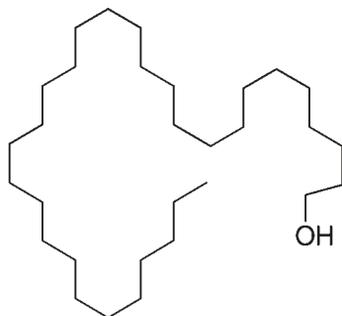
Los catalizadores de Ru de Grubbs permiten la polimerización en presencia de aditivos, estabilizantes y otros componentes. Las reacciones RCM y CM se utilizan en la industria para la fabricación de diversos productos, mientras que las ROMP y ADMET se utilizan mucho en la fabricación de polímeros con propiedades muy especiales. Por ejemplo, Hitachi Chemicals fabrica utilizando catalizadores de rutenio el polímero «Metathene», cuyo nombre da idea de la tecnología de metátesis aplicada. Una combinación de las dos primeras reacciones puede originar una enorme variedad de oligómeros o polímeros funcionalizados que van teniendo muchas aplicaciones,

como los polímeros «telequélidos», que suelen poseer grupos funcionales terminales (generalmente hidroxilo o ácido carboxílico) capaces de formar enlaces con otras moléculas y producir por copolimerización materiales termoplásticos (37). Otro ejemplo es la ROMP de dicitopentadieno (CCPD), que origina resinas con una gran resistencia a la corrosión y al impacto. Éstas se aplican en la industria aeroespacial, en la fabricación de materiales para el deporte y la marina, en balística, y en aparatos microelectrónicos. Algunos cristales líquidos ferroelectrónicos (FLC) se pueden preparar por polimerización ADMET.



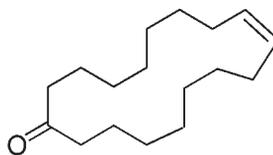
Cristales líquidos ferroelectrónicos

Además de varios polímeros hay muchos compuestos de interés industrial que podrían obtenerse más eficazmente utilizando procesos de metátesis. Citaremos a los diácidos y diésteres insaturados, que son intermedios en varios procesos, al 1-triacontanol, que es un estimulante del crecimiento de las plantas a través de la activación de genes que expresan enzimas que controlan la fotosíntesis, o a ciertos macrociclos, como la civetona, un ingrediente muy común de los perfumes almizclados.



Triacontanol

Estimulante del crecimiento de plantas



Civetona

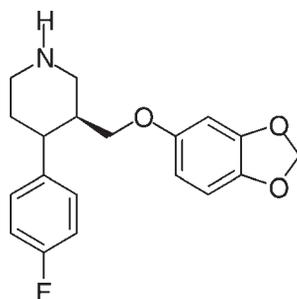
Componente de perfumes almizclados

En un futuro parece que se aplicará también, dentro de la denominada «química verde», para obtener productos de interés a partir de productos biodegradables como son los aceites y grasas (38). Cuando se aplica esta metodología en la industria, suele usarse la catálisis heterogénea por su más fácil implantación, pero la mucha mayor eficacia de la catálisis homogénea (39), hace que ésta también se utilice y que se prevea una mayor extensión en el futuro.

Un buen ejemplo de mejora de la producción industrial de compuestos utilizando reacciones de metátesis es la síntesis de feromonas de insectos, que pueden controlar las plagas de los cultivos sin dañar al ecosistema debido a que actúan saturando los órganos sensoriales de los insectos machos, atrapándolos o evitando su apareamiento. Entre ellas se encuentran el acetato de (*E*)-5-decenilo y diferentes mezclas de acetato de (*E*)- y (*Z*)-11-tetradecenilo, que son las feromonas de *Anarsia lineatella* y *Platynota stultana* y de la polilla *Sparganothis*, respectivamente. La producción industrial de algunas de estas feromonas es de 2.000 kg/año.

Por otra parte, la asociación de los procesos de metátesis con otros también catalizados está dando lugar a la síntesis de productos que serían de muy difícil acceso. Por ejemplo, cuando una olefina reacciona con aldehído crotónico en presencia del catalizador de Grubbs de segunda generación se obtienen aldehídos α , β -insaturados, que son los sustratos del catalizador de MacMillan. Éste posee una estructura asimétrica y actúa sobre dichos compuestos originando grandes excesos enantioméricos en una gran variedad de

reacciones y productos. Así ocurre en la síntesis de (S)-ketorolaco, un antiinflamatorio que se producía en forma racémica antes de aplicar este procedimiento. También se han aplicado las reacciones de metátesis a la producción industrial del antidepresivo Paxil, de GlaxoSmithKline, utilizando como intermedio el *p*-fluorocinamaldehído, que se sintetiza de forma muy eficiente por metátesis cruzada entre *p*-fluoroestireno y el crotonaldehído (40).



Paxil

La historia continúa con un largo etcétera, en donde adquiere relevancia su aplicación en materiales para la nanotecnología, como son los biosensores o los materiales para la liberación controlada de fármacos. Un ejemplo reciente de esta última aplicación lo encontramos en los trabajos de Nguyen, dirigidos a la síntesis de nanopartículas formadas por conjugados del antitumoral doxorrubicina.

Es sabido que los tumores sólidos poseen una permeabilidad aumentada, permitiendo que nanopartículas de determinado tamaño se acumulen en ellos de forma selectiva. En este sentido, son particularmente útiles las macromoléculas anfifílicas, que contienen un fármaco en su interior. Debido a que en los tumores sólidos el pH intersticial es bajo, y que en el compartimento intracelular de los fagosomas de las células de cáncer de mama metastásico el pH es menor o igual a 4,0, un enlace de tipo carbamato entre los grupos amino de doxorrubicina e hidroxilo del *exo*-5-norbornen-2-ol (**1**) se puede hidrolizar *in vivo* en estos medios y, de esta forma, liberar el fármaco. En el ejemplo que aquí hemos seleccionado se ha utilizado para obtener un material con propiedades anfifílicas la co-

REFERENCIAS Y NOTAS

- (1) TSUJI, J. y HASHIGUCHI, S. (1980): «Application of olefin metathesis to organic synthesis. Syntheses of civetone and macrolides». *Tetrahedron Lett.* 21: 2955.
- (2) Para una revisión de estas diferentes reacciones de metátesis, ver: «Alkene Metathesis in Organic Synthesis», *Top. Organomet. Chem.* 1998, 1. a) SCHROCK, R. R.: «Olefin Metathesis by Well-Defined Complexes of Molybdenum and Tungsten», pág. 1. b) FÜRSTNER, A.: «Ruthenium-Catalyzed Metathesis Reactions in Organic Synthesis», pág. 37. c) NICOLAOU, K. C.; KING, N. P.; HE, Y.: «Ring-Closing Metathesis in the Synthesis of Epothilones and Polyether Natural Products», pág. 73. d) HOVEYDA, A. H.: «Catalytic Ring-Closing Metathesis and the Development of Enantioselective Processes», pág. 105. e) MORI, M.: «Enyne Metathesis», pág. 133. f) GIBSON, S. E.; KEEN, S. P.: «Cross-Metathesis», pág. 155. g) TINDALL, D.; PAWLOW, J. H.; WAGENER, K. B.: «Recent Advances in ADMET Chemistry», pág. 183. h) KIESSLING, L. L.; STRONG, L. E.: «Bioactive Polymers», pág. 199.
- (3) SCHNEIDER, M. F.; LUCAS, N.; VELDER, J. y BLECHERT, S. (1997): «Selective Ring-Opening Olefin Metathesis of Functionalized Monosubstituted Olefins». *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 257.
- (4) KATZ, T. J.; SIVAVEC, T. M. (1985): «Metal-catalyzed rearrangement of alkene-alkynes and the stereochemistry of metallacyclobutene ring opening», *J. Am. Chem. Soc.* 107: 737.
- (5) Para revisiones específicas sobre metátesis de eninos ver, entre otras: a) DIVER, S. T.; GIESSERT, A. J. (2004): «Enyne Metathesis (Enyne Bond Reorganization)», *Chem. Rev.* 104: 1317. b) POULSEN, C. S.; MADSEN, R. (2003): «Enyne Metathesis Catalyzed by Ruthenium Carbene Complexes». *Synthesis.* 1.
- (6) MORTREUX, A. y BLANCHARD, M. (1974): «Ring closing alkyne metathesis (RCAM)», *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 786.
- (7) Para una revisión de la metátesis de alquinos ver: FÜRSTNER, A., en *Handbook of metathesis*, Grubbs, R. H.; Wiley, 2003, vol. 2, Ch. 2.12.
- (8) Para una revisión reciente que comprende aspectos históricos, ver: ASTRUC, D. (2005): «The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments». *New J. Chem.*, 29: 42.
- (9) a) HÉRISSON, J. L.; CHAUVIN, Y. (1971): «Catalysis of olefin transformations by tungsten complexes. II. Telomerization of cyclic olefins in the presence of acyclic olefins». *Makromol. Chem.* 141: 161. b) Para una discusión general, ver: GRUBBS, R. H. (1992), en *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Wilkinson, G.; Stone, F. G. A.; Abel E. W. (Eds.), Vol. 8, cap. 54, Pergamon. c) ADLHART, C.; HINDERLING, C.; BAUMANN, H.; CHEN, P. (2000): «Mechanistic Studies of Olefin Metathesis by Ruthenium Carbene Complexes Using Electropray Ionization Tandem Mass Spectrometry», *J. Am. Chem. Soc.* 122: 8204. d) VYBOISHCHIKOV, S. F.; BÜHL, M.; THIEL, W. (2002): «Mechanism of olefin metathesis catalyzed by ruthenium carbene complexes: density functional studies on model systems», *Chem. Eur. J.* 8: 3962.

- (10) CHAUVIN, Y., HÉRISSON, J. L. (1973): «An Investigation of Model Catalyzed Hydrocarbon Formation Reactions». *Seances Acad. Sci., Ser. C.* 276: 169.
- (11) BARLUENGA, J.; SANTAMARÍA, J., TOMÁS, M. (2004): «Synthesis of Heterocycles via Group VI Fischer Carbene Complexes», *Chem. Rev.* 104: 2259.
- (12) a) MCGINNIS, J.; KATZ, T. J., HURWITZ, S.: «Selectivity in the olefin metathesis of unsymmetrically substituted ethylenes», *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 605. b) Katz, T. J.; McGinnis, J.; Altus, C.: «Metathesis of a cyclic trisubstituted alkene. Preparation of polyisoprene from 1-methylcyclobutene», *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 606. c) Lee, S. J.; McGinnis, J., Katz, T. J.: «Directional specificity and stereoselectivity in the metathesis of a trisubstituted olefin», *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 7818.
- (13) SCHROCK, R. R. (1974): «Alkylcarbene complex of tantalum by intramolecular α -hydrogen abstraction». *J. Am. Chem. Soc.* 96: 6796.
- (14) a) SCHROCK, R. R.; McLAIN, S., SANCHO, J. (1979): «Preparation and characterization of tantalum(III) olefin complexes and tantalum(V) metallacyclopentane complexes made from acyclic α -olefins». *J. Am. Chem. Soc.* 101: 4558. b) BRE, A.; CHAUVIN, Y., COMMEREUC, D. (1986): «Mode of decomposition of titanacyclopentanes, model of the intermediate species in the dimerization of olefins catalyzed by titanium complexes». *Nouv. J. Chim.* 10: 535. c) CHAUVIN, Y., OLIVIER, H. (1996), en *Applied Homogeneous Catalysis*, eds. B. Cornils y W. A. Herrmann, VCH, vol. 1, cap. 2.3.1 y 2.3.6.
- (15) SCHROCK, R. R.; ROCKLAGE, S. M.; WENGROVIUS, J. H.; RUPPRECHT, G., FELDMANN, J. (1980): «Preparation and Characterization of Active Niobium, Tantalum, and Tungsten Metathesis Catalysts». *J. Mol. Catal.* 8: 73.
- (16) a) WENGROVIUS, J. H.; SCHROCK, R. R.; CHURCHILL, M. R.; MISSERT, J. R., YOUNGS, W. J. (1980): «Multiple metal-carbon bonds. 16. Tungsten-oxo alkylidene complexes as olefins metathesis catalysts and the crystal structure of W(O)(CHCMe₃(PEt₃)Cl₂)». *J. Am. Chem. Soc.* 102: 4515. b) SCHROCK, R. R.; MURDZEK, J. S.; BAZAN, G. S.; ROBBINS, J.; DIMARE, M., O'REGAN, M. (1990): «Synthesis of molybdenum imido alkylidene complexes and some reactions involving acyclic olefins», *J. Am. Chem. Soc.* 112: 3875. c) BAZAN, G. C.; KHOSRAVI, E.; SCHROCK, R. R.; FEAST, W. J.; GIBSON, V. C.; O'REGAN, M. B.; THOMAS, J. K.; DAVIS, W. M. (1990): «Living ring-opening metathesis polymerization of 2,3-difunctionalized norbornadienes by Mo(:CHBu-tert)(:NC₆H₃Pr-iso₂-2,6)(OBu-tert)₂». *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8378. d) BAZAN, G. C.; OSKAM, J. H.; CHO, H. N.; PARK, L. Y., SCHROCK, R. R. (1991): «Living ring-opening metathesis polymerization of 2,3-difunctionalized 7-oxanorbornenes and 7-oxanorbornadienes by Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-iso-Pr₂-2,6)(O-tert-Bu)₂ and Mo(CHCMe₂R)(NC₆H₃-iso-Pr₂-2,6)(OCMe₂CF₃)₂», *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6899.
- (17) a) ASTRUC, D. (2004): «Química Organometálica», Ed. Reverté, Barcelona. b) JOLLY, P. W., PETTIT, R. (1966): «Evidence for a Novel Metal-Carbene System», *J. Am. Chem. Soc.* 88: 5044.
- (18) GRUBBS, R. H. (1972): «Possible intermediate in the tungsten-catalyzed olefin metathesis reaction». *J. Am. Chem. Soc.* 94: 2538.

- (19) NOVAK B. M., GRUBBS, R. H. (1988): «Catalytic organometallic chemistry in water: the aqueous ring-opening metathesis polymerization of 7-oxanorbornene derivatives». *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7542.
- (20) NGUYEN, S. T.; JOHNSON, L. K.; GRUBBS, R. H., ZILLER, J. W. (1992): «Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media». *J. Am. Chem. Soc.* 114: 3974.
- (21) ARDUENGO, A. J., BANNENBERG, T. (2002): «Nucleophilic carbene complexes and their applications in modern Complex catalysis», *The Strem Chemiker*, Vol. XXIV, pág. 4.
- (22) KINSBURY, J. S.; HARRITY, J. P. A.; BONITATEBUS, P. J., HOVEYDA, A. H. (1999): «A Recyclable Ru-Based Metathesis Catalyst». *J. Am. Chem. Soc.* 121: 791.
- (23) a) Aunque se ha impuesto la denominación de «catalizadores» para los complejos que se utilizan en las reacciones de metátesis practicadas en medios homogéneos, deberían ser denominados «iniciadores», ya que, salvo con algunas excepciones, se destruyen en el proceso de metátesis. b) GARBER, S. B.; KINGSBURY, J. S.; GRAY, B. L., HOVEYDA, A. H. (2000): «Efficient and Recyclable Monomeric and Dendritic Ru-Based Metathesis Catalysts». *J. Am. Chem. Soc.* 122: 8168.
- (24) CONNON, S. J., BLECHERT, S. (2002): «Recent Developments in Olefin Cross-Metathesis». *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 1900.
- (25) Para revisiones de metátesis entre olefinas y eninos, ver: PRUNET, J., GRIMAUD, L. (2005): *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II*, Vol. 1 (Eds.: Katritzky, A. R.; Taylor, R. J. K), Elsevier, Oxford, pp. 669-722.
- (26) Ver: NICOLAOU, K. C. (2003), en *Classics in Total Synthesis II*, Wiley, cap. 7.
- (27) CLARK, T. D., GHADIRI, M. R. (1995): «Supramolecular Design by Covalent Capture. Design of a Peptide Cylinder via Hydrogen-Bond-Promoted Inter-molecular Olefin Metathesis». *J. Am. Chem. Soc.* 117: 12364.
- (28) a) NICOLAOU, K. C.; GUY, R. K.; POTIER, P. (1996): «Taxoids: New Weapons Against Cancer». *Sci. Am.* 274: 94. b) MUHLRADT, P. F., SASSE, S. (1997): «Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity». *Cancer Research.* 57: 3344.
- (29) BALOG, A.; MENG, D.; KAMENECKA, T.; BERTINATO, P.; SU, D.-S.; SORENSEN, E. J., DANISHEFSKY, S. J. (1996): «Total Synthesis of (-)-Epothilone A». *Angew. Chem. Int. Ed.* 108: 2976. b) YANG, Z.; HE, Y.; VOURLOUMIS, D.; VALLBERG, H., NICOLAOU, K. C. (1997): «Total Synthesis of Epothilone A», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 166.
- (30) NICKEL, A.; MARUYAMA, T.; TANG, H.; MURPHY, P. D.; GREENE, V.; YUSUFF, N., WOOD, J. L. (2004): «Total Synthesis of Ingenol». *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 16300.
- (31) NICOLAOU, K. C.; VASSILIKOGIANNAKIS, G., MONTAGNON, T. (2002): «The Total Synthesis of Coleophomones B and C». *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 3276.
- (32) a) DEITHERS, A.; MARTIN, S. F. (2004): «Synthesis of Oxygen- and Nitrogen-Containing Heterocycles by Ring-Closing Metathesis». *Chem. Rev.* 104: 2199. b) MARTIN, S. F. (2003), en *Handbook of Metathesis*, ed. R. H. Grubbs, Wiley, vol. 2, cap. 2-9.

- (33) GHOSH, A. K., LEI, H. (2000): «Enzymatic Acylation and Ring-Closing Olefin Metathesis: A Convenient Strategy for the Lactone Moiety of Compactin and Mevinolin». *J. Org. Chem.* 65: 4779.
- (34) LEE, E.; CHOI, S. J.; KIM, H.; HAN, H. O.; KIM, Y. K.; MIN, S. J.; SON, S. K.; LIM, S. M., JANG, W. S. (2002): «Total Synthesis of Ambruticin». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41: 176.
- (35) a) MILLER, S. J.; BLACKWELL, H. E., GRUBBS, R. H. (1996): «Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides». *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 9606. b) MILLER, S. J., GRUBBS, R. H. (1995): «Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis». *J. Am. Chem. Soc.* 117: 5855.
- (36) a) POSTEMA, M. H. D.; PIPER, J. L.; KOMANDURI, V., LIU, L. (2004): «A Double Ring-Closing Metathesis Approach for the Synthesis of β -C-Trisaccharides». *Angew. Chem., Int. Ed.* 43: 2915. b) PISCOPIO, A. D., ROBINSON, J. E. (2004): «Recent applications of olefin metathesis to combinatorial chemistry», *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 245.
- (37) HILLMEYER, M. A., BATES, F. S. (1995): «Metathesis Polymerization of Cyclooctadiene Using Discrete Metal Alkylidenes». *Macromolecules*, 28: 8662.
- (38) MOL, J. C. (2002): «Application of olefin metathesis in oleochemistry: an example of green chemistry». *Green Chem.* 4: 5.
- (39) DINGER, M. B., MOL, J. C. (2002): «High turnover numbers with ruthenium-based metathesis catalysts». *Adv. Synth. Catal.* 671.
- (40) a) PEDERSON, R. L.; FELLOWS, I.; UNG, T. A.; ISHIHARA, H., HAJELA, S. P. (2002): «Applications of olefin cross metathesis to commercial products». *Adv. Synth. Catal.* 344: 728. b) ROUHI, A. M. (2002): «Olefin Metathesis: Big-Deal Reaction». *Chem. & Eng. News.* 80: 29. c) BERTIN, P. A.; SMITH, D. D., NGUYEN, S-B. T. (2005): «High-density doxorubicin-conjugated polymeric nanoparticles via ring-opening metathesis polymerization». *Chem. Commun.* 3793.

**Descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*
y su impacto en las enfermedades
gastroduodenales: Premio Nobel 2005,
merecido aunque retrasado**

Recibido el 2 de febrero de 2006

JOSÉ MARÍA PAJARES GARCÍA
Catedrático Emérito de Medicina. UAM

RESUMEN

La asamblea Nobel resumía la aportación de Marshall y Robin a la ciencia médica: «Extraordinario e inesperado descubrimiento que la inflamación del estómago (gastritis), así como la úlcera de estómago o duodeno (enfermedad ulcerosa péptica), son el resultado de una infección del estómago causada por la bacteria *Helicobacter pylori* (Hp)».

Ambos investigadores contribuyeron de forma diferente: Warren, anatómopatólogo, observó la bacteria en el tejido inflamado de la mucosa gástrica, considerándola agente causal. También lo identificó en la úlcera gástrica y duodenal. La utilización de colorantes de plata y la microscopía electrónica colaboraron.

Marshall, gastroenterólogo, logró cultivar la bacteria con la aplicación de medios adecuados. Para cumplir el decisivo postulado de Koch, se autoinoculó con ingestión de un cultivo de *Helicobacter*, enfermando de gastritis que curó con antibióticos. Inició la terapéutica antiinfecciosa y planificó ensayos clínicos para conseguir pautas terapéuticas eficientes. Ideó la prueba diagnóstica de Ureasa en la biopsia gástrica (CLO-test) y el de aliento con urea marcada con C14.

Este descubrimiento, al principio criticado y no aceptado por muchos, estimuló a otros para investigar lesiones de la mucosa gástrica por Hp. Estudios epidemiológicos demostraron la prevalencia de 20-80% en población asintomática, variable en relación con nivel económico, social e higiénico-sanitario. En enfermos de gastritis, úlcera péptica, carcinoma gástrico y linfoma, la infección alcanza de un 80-100%. En consecuencia, su diagnóstico incluye los métodos histológico, cultivo, prueba de ureasa, de aliento, serología y otros. El tratamiento introduce antibióticos.

Palabras clave: Premio Nobel Medicina.—*Helicobacter pylori*.—Marshall-Warren Premio Nobel.—Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2005.—*Helicobacter pylori* gastritis.—*Helicobacter pylori* úlcera péptica.

ABSTRACT

The discovery of the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastro-duodenal diseases: The Nobel Prize 2005, deserved but delayed

The Nobel Assembly summarized the contribution of Marshall and Robin to the medical science: «the remarkable and unexpected discovery that inflammation in the stomach (gastritis) as well as ulceration of the stomach or duodenum (peptic ulcer disease) is the result of an infection of the stomach caused by the bacterium *Helicobacter pylori*».

The contribution of both researchers were different: Warren, pathologist, observed the bacterium in the inflamed gastric tissue and ascribed it as causal agent. Also, he identified the bacterium in the inflamed tissue of the gastric and duodenal ulcer. The use of silver staining and electron-microscopy contributed to identify the bacterium.

Marshall, gastroenterologist, obtained the bacterium culture by the use of a suitable nutritious media. To fulfil the Koch's postulates he self-inoculated by oral ingestion of a *Helicobacter* culture resulting en acute gastritis that cured by antibiotics. Also, he planned clinical assays to achieve efficient eradication regimes. He discovered the rapid urease test with gastric biopsies (CLO-test) and the 14C-urea breath test for the diagnosis.

The Hp discovery, criticized at the beginning and non-accepted by the most, inspired and stimulated to many others to research on the injuries of the gastro-duodenal mucosa related to Hp infection. In fact, epidemiological studies showed 20-80% prevalence of Hp in healthy people, variable in relationship to economic, social and hygienic levels. In patients with gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma and lymphoma the infection achieved 80-90%. Consequently, their diagnosis included the histology, culture, urease, urea breath test and others. Their treatment is based on antibiotics to cure the infection.

Key words: *Helicobacter pylori*.—Nobel Prize in Medicine.—Marshall-Warren Nobel Prize.—Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005.—*Helicobacter pylori* gastritis.—*Helicobacter pylori* peptic ulcer.

El 3 de octubre de 2005, la Nobel Assembly at Karolinska Institutet otorgó el Premio Nobel en Fisiología y Medicina de 2005, conjuntamente, a Barry J. Marshall y J. Robin Warren por su descubrimiento de: «The bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease».

Resumían su aportación a la ciencia con estas palabras: «extraordinario e inesperado descubrimiento que la inflamación del estómago (gastritis), así como la úlcera de estómago y duodeno (enfermedad ulcerosa péptica) son el resultado de una infección del estómago causada por la bacteria *Helicobacter pylori*» (1).

Han transcurrido veintidós años desde que Warren y Marshall dieron a conocer al mundo científico sus hallazgos en dos breves cartas enviadas, separadamente, al editor de la prestigiosa revista *Lancet*, que fueron publicadas el 4 de junio de 1983. Encabezaban las cartas el mismo y único título: «Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis» (2, 3), que ha sido citado, desde entonces, miles de veces en las principales revistas médicas. Su importancia radica en la modificación de conceptos etiopatogénicos, en el cambio en la práctica clínica de diagnóstico y terapéutica de las enfermedades de estómago y duodeno, especialmente de la úlcera péptica.

HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO

Ambos investigadores jugaron un papel diferente, aunque complementario, en el descubrimiento: Robin Warren tenía cuarenta y dos años y ocupaba una posición de Consultor Patólogo o Anatómopatólogo en el Hospital Real de Perth (Australia). Barry Marshall había cumplido treinta y dos años y seguía un programa de formación de Medicina Interna y Gastroenterología en el Servicio de Medicina del mismo Hospital.

Warren observó la bacteria que relacionó con la inflamación de la mucosa gástrica o gastritis, por primera vez el 11 de junio de 1979, día de su 42 cumpleaños. Comenta su hallazgo de esta forma: «Trabajaba en mi diaria tarea de examinar las preparaciones para estudio microscópico de las biopsias gástricas. En una preparación de mucosa gástrica con gastritis crónica activa, observé una **línea azul** en la superficie del epitelio gástrico que nunca había visto. Con mayor aumento pude distinguir numerosos **pequeños bacilos** que componían la línea azul, firmemente adheridos a la superficie del epitelio. Cuando apliqué el objetivo de inmersión en aceite, comprobé con claridad que eran bacterias. Entusiasmado, comuniqué el hallazgo a mi

colega Doctor Len Matz, uno de los más prestigiosos anatomopatólogos de Perth, que trabajaba en el mismo Departamento. Le invité a mirar la preparación; para mi desgracia no vio las bacterias» (4).

Durante los 18 meses siguientes, estudió y recogió más casos en los que la bacteria acompañaba, siempre, a las lesiones histológicas de gastritis. La imagen de la bacteria se había adueñado de su memoria. Le obsesionaba. Le obligaba a permanecer en el Laboratorio hasta la madrugada. Su cerebro trabajaba día y noche, de forma insistente en buscar una relación entre la bacteria y la inflamación de la mucosa gástrica. Como patólogo tenía claro que la presencia de bacterias en cualquier tejido inflamado debía ser considerada agentes causales. Pero, recordaba las enseñanzas y los dogmas mantenidos durante más de cien años, que aseguraban que las bacterias no crecían en el estómago, porque el medio ácido originado por la secreción gástrica de ácido clorhídrico, lo impedía (4). Nadie creía en él, excepto su esposa Win, médico psiquiatra, quien le animaba con entusiasmo. Lo reconocía Warren en una entrevista con estas palabras: «admiro a mi esposa y le agradezco su ayuda moral porque, madre de cinco hijos y teniendo toda la razón para estar disgustada, su marido había gastado su tiempo y su dinero buscando “no-existentes” bacterias, no obstante, le escuchaba y fortalecía cuando regresaba a casa, a veces, de madrugada» (5). Ahora, cuando piensa en aquellos días, cree que su esposa disponía de todos los argumentos para haberle obligado a consultar como enfermo, a sus compañeros psiquiatras (4).

Sin embargo, no todo era negativo. La nueva tecnología de fibroendoscopia, usada en la rutina clínica para diagnosticar enfermedades del estómago suministraba biopsia de mucosa gastroduodenal, lo que permitía estudiar la mucosa fijada en formol, con inmediatez a su toma. Con anterioridad, las muestras procedían de resecciones gástricas quirúrgicas que solían permanecer varias horas antes de la fijación en formol. Otras veces procedían de autopsias parcial o totalmente, autodigeridas por el jugo gástrico péptico. Lo que impedía apreciar detalles microscópicos de las lesiones. Ello explica, que su interés principal fueran las úlceras y el cáncer; desdeñaban a las gastritis crónica por su irrelevancia clínica.

Warren poseía una mente lógica, aumentada por el estudio de las matemáticas. También dominaba las técnicas de coloraciones histo-

lógicas. Para identificar los componentes de la «línea azul» probó varios colorantes. Con la tinción de Gran consiguió teñir la bacteria de color azul. Ensayó con la tinción de Wartin y Starry, colorante argéntico, el más adecuado para espiroquetas, obteniendo unas imágenes negras de las bacterias (Figura 1). Posteriormente, examinó con el microscopio electrónico, observando los cuerpos bacterianos adheridos con firmeza a la superficie del epitelio (Figura 2). Len Matz, su compañero, también los vio y le dijo: «si realmente crees que es un hallazgo importante, continúa la búsqueda en más pacientes» (4).

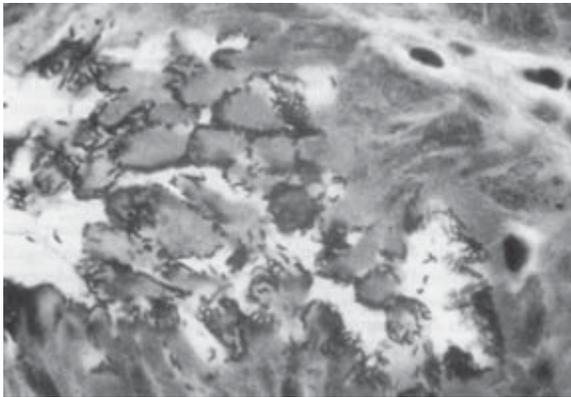


FIGURA 1. *Bacterias Campylobacter-like* teñidas con colorantes de plata, siguiendo el método de Warthin-Starry. Primer caso de gastritis causada por esta bacteria (tomada de referencia 4, con permiso del autor).

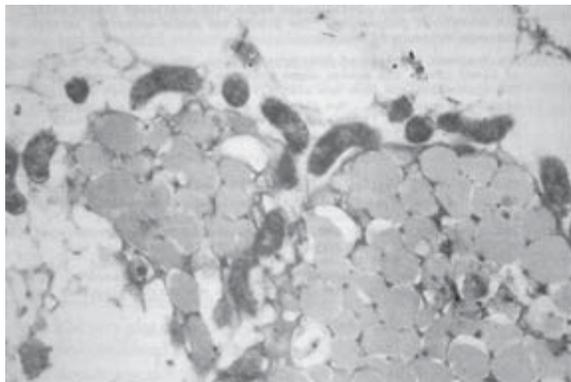


FIGURA 2. *Imágenes de la bacteria* tomadas por microscopía electrónica (tomada de referencia 4, con permiso del autor).

Su intuición de que la bacteria causaba la gastritis adquirió mayor evidencia con los datos obtenidos por investigadores clínicos y básicos con el uso rutinario de la Fibroendoscopia en el diagnóstico de las enfermedades gástricas y duodenales. Muy particularmente le inspiró el término de «actividad aguda» y el concepto dinámico de gastritis postulado en la clasificación de Whitehead, Truelove y Gear (6).

Warren prosigue la búsqueda de bacterias en todas las preparaciones histológicas de gastritis crónica con «actividad aguda». En casi todas, las bacterias aparecían en focos pequeños. Aunque la presencia era evidente, no convencía a sus compañeros de su patogenicidad, incluso, algunos dudaban de que fueran bacterias. Para asegurarse, muestra las imágenes de microcopia electrónica (ME) a los expertos, quienes confirman como bacterias similares a las observadas y publicadas previamente por Fung y col. (7).

No dejaba de pensar en la posibilidad de que las bacterias fueran saprofitas. ¿Cómo demostrarlo? Si no son patógenas, debieran colonizar la mucosa gástrica normal. Nueva tarea: localizar preparaciones de mucosa gástrica normal sin infiltrado inflamatorio. El trabajo no resultó fácil. Finalmente, localizó veinte casos en los que la histología no mostraba inflamación y las bacterias no aparecieron.

APORTACIÓN DE BARRY MARSHALL

Barry Marshall, de treinta y un años, seguía el programa de especialización clínica del Real Colegio de Médicos de Australia. El programa tenía un ciclo de tres años de especialización avanzada, con una rotación de seis a doce meses por especialidades. Una exigencia del programa era la realización y presentación anual de un trabajo de investigación. Su Jefe le indica un tema, que rechaza porque le pareció poco interesante e irrelevante. Si quieres algo interesante, contesta, posiblemente lo encuentres en el Departamento de Anatomía Patológica. Visita al «Chalado» de Warren, que está intentando convertir las gastritis en «**una enfermedad infecciosa**».

En la primera entrevista (Figura 3), Marshall, aunque no quedó muy convencido de las explicaciones de Warren, aceptó el compromiso de biopsiar a veinte pacientes con endoscopia de la mucosa

gástrica normal. Con satisfacción comprobó la ausencia de bacteria. Desde entonces se apasionó por el proyecto, al que dedicó toda su inteligencia, su voluntad y su tiempo laboral y de ocio. Ambos investigadores diseñaron un ensayo clínico sobre cien pacientes consecutivos. Elaboraron un minucioso protocolo, en el que constaba un detallado cuestionario clínico y metodológico de las zonas de la mucosa gástrica, donde deberían recogerse biopsias para estudio histopatológico y para cultivo microbiológico.

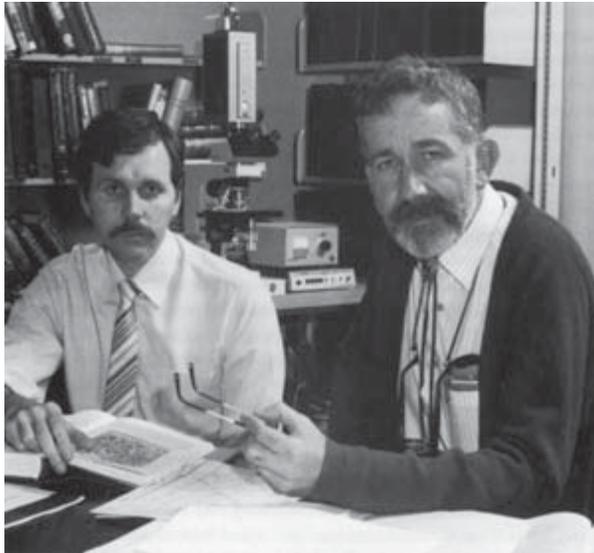


FIGURA 3. Fotografía de Warren y Marshall realizada en julio de 1984 (tomada de referencia 8, con permiso del autor).

Los microbiólogos colaboraron en el cultivo. Por su parecido al *Campylobacter* eligieron el medio y el tiempo de incubación utilizado para esta bacteria. Con este método fracasaron los primeros intentos. Sin embargo el azar o fortuna, que tantas veces ha ayudado a los investigadores tenaces, facilitó el éxito. Resumo el acontecimiento: vacaciones de cinco días de Semana Santa. A la vuelta, la Técnico de Laboratorio retira la placa de cultivo de la biopsia 35, olvidada en la cámara de cultivo. Como acostumbraba, observa la placa y comprueba la existencia de «Tiny transparent colonies» (minúsculas colonias transparentes). Procede a la extensión y coloración. Las bacterias identificadas son similares a las observadas en las prepa-

raciones histológicas. De la misma forma, el azar premió al bacteriólogo Alexander Fleming en septiembre de 1928, al observar que en una placa de cultivo de estafilococos abandonada durante varios días en el laboratorio, habían crecido colonias del hongo «penicillium» en medio de las colonias de estafilococos a las que había destruido.

Marshall, todavía escéptico, lo manda examinar con ME. Las imágenes muestran bacterias curvas, como el *Campylobacter*, del que difería por la existencia de cuatro flagelos en forma de palillo de tambor, salientes de una de las extremidades, lo que sugería que se trataba de una nueva bacteria. Sin embargo, inicialmente recibió el nombre de «*Campylobacter pilory-like*», por su parecido y por localizarse, preferentemente, en la mucosa pilórica. Su definitivo nombre sería *Helicobacter*. Con algunas modificaciones metodológicas logran incrementar el número de crecimientos y eliminar los falsos positivos.

Marshall dirige el ensayo clínico. Anima a los clínicos a participar en el estudio, enviando pacientes para completarlo. Finalizado, reúne todos los documentos del protocolo y los lleva, junto a su familia, a un pueblo alejado de Perth, donde debería practicar un año de médico rural. Examinados los informes comprueba la presencia de la bacteria en trece pacientes de Úlcera Duodenal (UD), y en 24 de 28 examinados de Úlcera Gástrica (UG). Por lo que concluye que la bacteria «*Campylobacter-like*» estaba presente en gastritis crónica activa, podía cultivarse y se relacionaba al cien por cien con la UD y en menor proporción con la UG.

INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS A LA COMUNIDAD CIENTÍFICA

En octubre 1982, Marshall presenta los datos iniciales en la reunión local del Colegio de Médicos que son muy criticados. Objetaban que no había gastritis en la UD. Para rebatir este argumento revisó la literatura y encontró un artículo de Magnus escrito en 1950 (12), en que informaba que el 100% de pacientes con UD padecían gastritis antral. En febrero de 1983 remiten un abstract a la Asociación Australiana de Gastroenterología, que no fue aceptado. El comité

científico, en la carta de respuesta, disculpaba la no aceptación por la limitación numérica de aceptar 56 de los 67 recibidos. El suyo carecía de interés científico.

La negativa no desanimó a los investigadores. Lo comentan con el patólogo David McGeachie. Les recomienda contactar con el microbiólogo Martín Skirrow (Inglaterra), quien aceptó examinar los resultados de los cultivos. Aconsejó, también, enviar el Abstract al Workshop sobre *Campylobacter*, organizado por los microbiólogos en Bruselas. Skirrow, entusiasmado, lo invita a su Hospital de Worcester a una Sesión de la Unidad de Endoscopia. En ella toman biopsias antrales a una paciente de ochenta años con UG. En la extensión teñida observan bacterias curvas Gran negativas que crecen en el cultivo con numerosas colonias.

El primer nombre de la nueva bacteria fue decidido en una comida organizada por Skirrow para Marshall, a la que había invitado a un prestigioso dermatólogo, descubridor del *Campylobacter laridis* en una gaviota, quien sugiere la denominación *Campylobacter-like* (por su parecido a esta bacteria) pilory o piloridis por su localización preferente en la región pilórica (9).

Presenta su primera comunicación con el título: «Spiral bacteria in the human stomach, a common finding in patients with gastritis and peptic ulceration». Consiguió interesar a prestigiosos microbiólogos asistentes que, desde ese momento, ampliaron su línea de investigación al *Campylobacter-like* pilory. Marshall, en su empeño de interesar a gastroenterólogos y patólogos en la investigación de esta bacteria, escribe a los que habían publicado artículos sobre gastritis y úlcera péptica, especialmente dedicados a las lesiones histopatológicas. Revisa la literatura y encuentra dos artículos muy interesantes: Uno que describe una epidemia de hipoclorhidria en un grupo de voluntarios sanos para un estudio con sondajes gástricos en un Hospital de Dallas, Texas. Telefona a Ramsey, principal autor del artículo, a quien pide que revise las preparaciones histológicas de la mucosa gástrica. En todas había gastritis con la bacteria espiral (11).

El otro refiere la historia de un paciente con hiperclorhidria por gastrinoma, que tras un episodio de gastritis aguda había disminuido la secreción gástrica. Pidió las preparaciones histológicas a Tytgat, uno de los autores (10). Comprobó la presencia de bacterias en

los focos de tejido inflamado. Estos hallazgos reforzaban la hipótesis de patogenicidad de la bacteria que, en la fase aguda, originaba inflamación aguda e hipoclorhidria.

En 1983, convencidos de la importancia de su descubrimiento deciden escribir un artículo. Discreparon en el contenido, en la redacción y en el orden en el que figurarían los autores. Surgió un amistoso celo entre ambos investigadores porque no querían ser coautores. Cada uno deseaba ser el primero en publicar. Lo solucionaron siguiendo el consejo de sus esposas de que enviaran, por separado, una carta con el mismo título.

David Fox, subdirector de la revista *Lancet*, mostró perplejidad al recibir las dos cartas con el mismo título, escritas por diferentes autores. Para conocer sus razones, habló con ellos. Warren argumentaba que había sido el primero en ver las bacterias, por lo que reclamaba su derecho de descubridor original. Marshall reivindicaba prioridad, porque había coordinado e impulsado los cultivos, el ensayo clínico, el contacto con otros microbiólogos, etc. Para complacerles, el editor publicó las cartas con el mismo título, primero la de Warren, como observación original. Después la de Marshall (Figura 4).

LA BÚSQUEDA DE FÁRMACOS PARA TRATAR LA INFECCIÓN

En octubre de 1981 tratan al primer paciente, varón anciano de origen ruso, con una intensa gastritis cuya biopsia mostraba innumerables *Campylobacter*. Le aplicaron tratamiento de tetraciclina durante catorce días, porque la especie *Campylobacter* es sensible a este antibiótico. Ellos sabían que, con este tratamiento, rozaban la ética y que el resultado obtenido era anecdótico, sin valor científico. Expuestas estas consideraciones al paciente, así como las dudas de la respuesta, el enfermo aceptó tomar el antibiótico. Con el tratamiento desaparece el dolor abdominal y las náuseas. En la endoscopia de control, aunque la mucosa gástrica seguía enrojecida, el componente inflamatorio agudo había mejorado en el estudio histológico y las bacterias habían desaparecido.

THE LANCET		
No 8336	BOSTON, MASS. AND LONDON · SATURDAY 4 JUNE 1983	VOL 1 FOR 1983
LETTERS TO THE EDITOR		
	Influence of Sedation on Mortality in Critically Ill Multiple Trauma Patients	1270
1262	Prof I. McA. Ledingham, Mr Ian Watt, FRCS	
	Potential Hazards of Prolonged Steroid Anaesthesia	1270
	Dr P. G. P. Lawler and others	
	Detection of Dengue Virus by Immunofluorescence Following Inoculation of Mosquito Larvae	1271
1264	Dr T. Pang and others	
	Maternal Chloroquine Prophylaxis and Sickle-cell Anaemia	1271
	Dr G. T. Nurse	
1268	Tetracycline for Chloroquine-resistant Malaria	1271
	Dr Nicholas White	
	Stability of Human Diploid Cell Rabies Vaccines	1272
1269	Dr Chantapong Wasi and others	
	Hepatitis Vaccination Policy for Hospital Staff	1272
1289	Prof C. J. Oon and others	
1289	Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis	1273
	Dr J. Warren; Dr Barry Marshall	
1289	Vasodilator Prostanoids and ACTH-Dependent Hypertension	1275
1289		

FIGURA 4. Citación de la carta en la primera página de *Lancet*, 4 de junio de 1983 (tomada de referencia 8 con permiso del autor).

Animados por el resultado, proyectan un ensayo terapéutico en los enfermos con UD y UG, infectados. ¿Cómo financiar el ensayo? ¿Qué fármacos elegir? Estos y otros muchos problemas no desanimaron a Marshall, a pesar de que era un joven desconocido, de una lejana ciudad, en el otro extremo del mundo. Como único mérito ofrecía la publicación de una carta en la revista *Lancet*, con un descubrimiento revolucionario, en el que muy pocos creían. Carecía de crédito para los Comités Científicos evaluadores de proyectos y para las Compañías farmacéuticas.

Su convencimiento de la importancia del hallazgo y su tenacidad le anima a contactar con el Director General de Smith-Kline-French, compañía farmacéutica descubridora de la Cimetidina (Tagamet) que había modificado el tratamiento de la úlcera péptica (UP). Se mostró

interesado. Le promete un Ordenador IBM y consultar con sus superiores la financiación del ensayo clínico en que se comparara el tratamiento de Tagamet frente a antibióticos en la UP. El ensayo no fue aceptado y el Director cesado, aunque cumplió su promesa de comprar el Ordenador (8).

En Holanda, la compañía farmacéutica Gist-Brocades había obtenido la sal de bismuto tripotasio-dicitrato-bismutato y comercializado con el nombre de Denol, que era usado en el tratamiento de la UP con gran satisfacción de los pacientes y de sus médicos. Dotada de una farmacocinética especial, impedía la absorción intestinal, al contrario de otras sales de bismuto utilizadas en el pasado, que se absorbían, acumulaban y resultaban tóxicas para algunos pacientes por lo que habían sido retiradas.

Gist-Brocades responde a la petición de ayuda de Marshall con el envío de varios artículos con resultados de ensayos clínicos sobre Denol en UP. Uno de ellos demostraba mejor epitelización y menor número de recidivas en pacientes de UP tratados con la sal de Bi que en los que recibieron Cimetidina (13). Otro, al estudiar las modificaciones de las lesiones histológicas de la mucosa duodenal antes y después del tratamiento con sales de Bi con microscopía electrónica (ME) en UD (14), comprobaba la desaparición de las bacterias, observadas en el borde de la úlcera. Inspirado en estos datos, incluye placas de Denol y de Cimetidina en cultivos de *Campilobacter pilory*. Demuestra «zonas de inhibición bacteriana» alrededor de la placa de Bi, que no aparecían en las placas de cimetidina. Lo interpreta como acción bactericida del Bi.

Con escasa información, aunque con base científica, Marshall diseña un ensayo clínico, prospectivo de pacientes para distribuir en dos brazos: en uno, los enfermos recibirían suspensión de Denol, y en el otro, Cimetidina. La condición de doble ciego no pudo cumplirse porque era investigador único. Sólo pudo reclutar quince pacientes en cada grupo. Los resultados no fueron satisfactorios porque comprobaron el mismo número de recidivas en los dos grupos. Algunos colegas, remitentes de enfermos, expresaron escepticismo y desánimo.

Sin embargo, no todo había sido negativo. El análisis de las biopsias demostró que la inflamación de gastritis había disminuido en los tratados con sales de Bi, mientras que no se modificó en los que

recibieron Cimetidina. ¿Por qué sólo uno de los quince tratados con Bi había curado la infección? Varias causas: los pacientes confesaron haberlo suprimido por el sabor desagradable de la suspensión de Denol; a otros, atendidos en Hospitales Privados, su médico les cambió a Cimetidina, de efectos más conocidos (8).

Una vez más, la suerte ayuda a los que persisten con fe en el proyecto. En efecto, en el seguimiento del protocolo, a un paciente con recidiva ulcerosa le recomienda Denol, en su nueva presentación de tabletas masticables. En el curso del tratamiento desarrolla una periodontitis que cura con Metronidazol. En la endoscopia de control, la UD había curado y desaparecida la bacteria. ¿Coincidencia o efecto sinérgico del Bi con metronidazol? Para contestar a la pregunta, Marshall prueba la susceptibilidad bacteriana del Metronidazol en diez cultivos. Demuestra áreas de inhibición bacteriana en nueve. Añade este antibiótico al Denol. Con la bi-terapia cura la infección (erradica) a ocho de diez pacientes tratados.

Durante el año 1984 experimenta otros antibióticos asociados a sales de Bi. Ensayo las pautas duales de Bi con amoxicilina o con eritromicina, que resultaron eficaces, aunque menos que con la anterior.

Ese mismo año, los dos investigadores habían redactado un artículo completo recopilando los datos obtenidos. Tras múltiples cambios, lo envían a la misma revista *Lancet*. Los editores tardan en aceptarlo, porque los revisores, a quienes habían remitido el artículo, no lo consideraban lo suficientemente importante como para ser publicado en esta prestigiosa revista. Los autores sugieren otros revisores, quienes, después de una meticulosa lectura y de alguna sugerencia, aconsejan su publicación. Los editores acompañaron al artículo una nota editorial muy elogiosa, destacando la originalidad e importancia del descubrimiento (15). En el mismo número aparecieron varias cartas relacionadas con la nueva bacteria: MacNulty y Watson, del laboratorio de Skirrow, referían el hallazgo de bacterias espirales en el antro gástrico (16); Langerberg y cols., de Amsterdam, comunican la existencia de ureasa en las bacterias; Eldridge y cols. mencionan la detección de anticuerpos anti-*Campylobacter* en pacientes infectados (17).

CUMPLIMIENTO DE LOS POSTULADOS DE KOCH

Posteriormente, varios grupos de investigadores publicaron resultados parecidos en otras revistas científicas. Los clínicos pasaron del rechazo a la duda. Para aceptar al *Campylobacter* como agente causal de gastritis y UP, precisaba cumplir uno de los postulados de Koch: la producción de la inflamación de la mucosa gástrica por la inoculación de la bacteria en un animal de experimentación.

En enero de 1984, Marshall acuerda con Stuart Goodwin, microbiólogo que trabajaba en el Departamento de Microbiología Experimental, la inoculación de cultivos puros de *Campylobacter* en cerdos. Eligieron a este animal porque padece gastritis y UP y porque su tamaño facilitaba las gastroscopias. Los experimentos fracasaron.

Marshall no se desanimaba. Sabía que la gastritis asociada a *Campylobacter*-like no es una enfermedad grave. Además, había comprobado la posibilidad de curación con antibióticos. Decide autoinocularse la bacteria. Su mente obsesiva trabajaba con este proyecto, que no comunica ni a su esposa ni a sus cuatro hijos. Informa a su Jefe Ian Hislop y a su amigo patólogo David Mac Gechie, que intentan disuadirle, exponiéndole diversos argumentos de índole científica y ética. Pese a las razones que desaconsejaban el auto-experimento, determina realizarlo.

¿Obraba irresponsablemente? ¿Actuaba como un héroe visionario? Ni lo uno, ni lo otro. Como él mismo ha afirmado en repetidas ocasiones, conocía el riesgo de infectarse, pero había comprobado su curación. Él confiaba en la eficacia de los antibióticos. En junio de 1984 acude en ayunas a la Unidad de Endoscopia, media hora antes de iniciarse la sesión diaria. Pide al Jefe que comience por él, porque, aunque no padecía molestias digestivas, quería comprobar la normalidad de su mucosa gástrica. Las biopsias gástricas resultaron normales.

En la misma sesión de endoscopias fue biopsiado un varón adulto con síntomas de dispepsia. La biopsia gástrica demostró gastritis. En el cultivo crecieron abundantes *Campylobacter*, sensibles al Metronidazol. El tratamiento de biterapia: sales de bismuto asociado a metronidazol curó la infección. La segunda endoscopia de control comprobó la desaparición de la inflamación y de las bacterias.

Marshall había seguido al evolución de esta paciente. Al conocer la curación eligió el cultivo de la misma para su inoculación personal. Separa 30 mL, que ingiere después de haber tomado 400 mgs de Cimetidina para disminuir la secreción gástrica (8). Los seis primeros días permaneció asintomático. Al séptimo día, intensas náuseas y vómitos le despertaron. Continuaron durante tres días más. El material de los vómitos tenía un color claro y carecía de sabor ácido. En el décimo día, repite la segunda endoscopia que realizan al final de la sesión, por el gran número de pacientes citados. A pesar de que sentía apatía y debilidad física, durante la mañana realizó el trabajo habitual. La endoscopia resultó mucho más molesta. La extensión de la biopsia mostró bacterias. En el cultivo crecieron *Campilobacter*. El examen histológico detectó signos de inflamación aguda en el epitelio y ligero infiltrado inflamatorio crónico en la lámina propia. También fueron observadas bacterias, en moderado número, con las tinciones de Hematoxilina eosina (Figura 5), pero en mayor número y agrupadas con los colorantes de plata (Figura 6) (8).

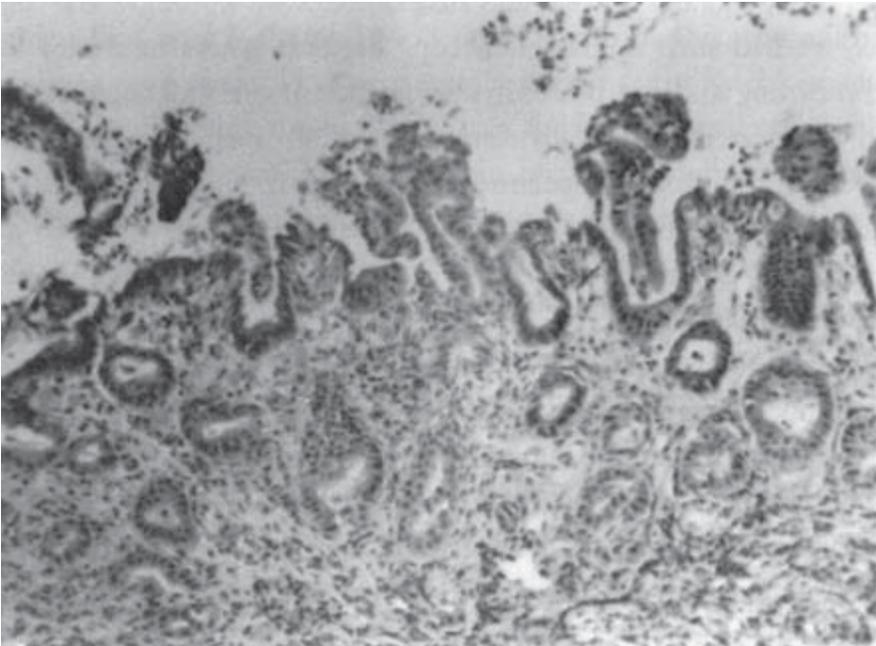


FIGURA 5. Muestra de la mucosa gástrica tomada por biopsia endoscópica en el décimo día de la inoculación (tomada de referencia 8, con permiso del autor).

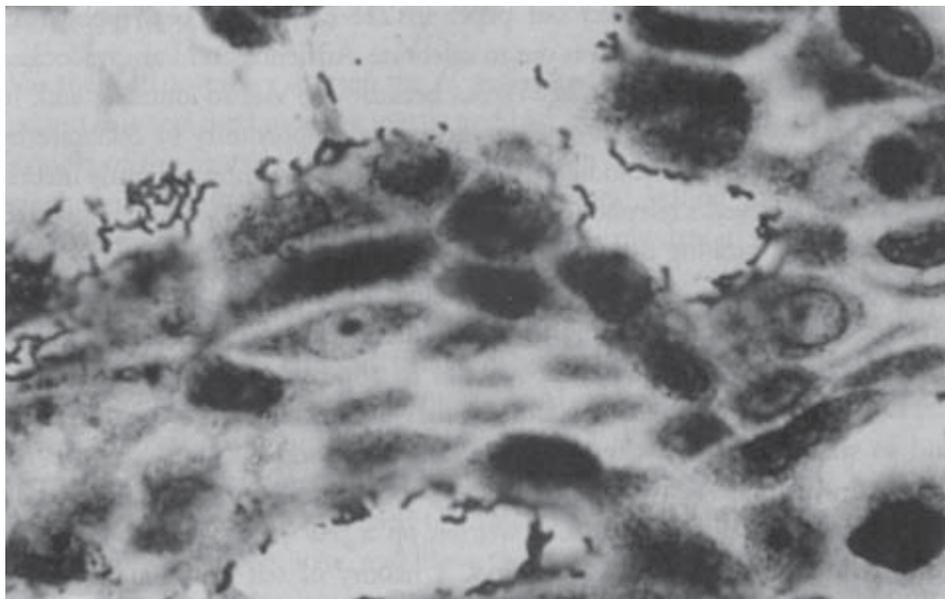


FIGURA 6. Morfología de las bacterias teñidas con el método de Warthin-Starry, obtenida en la muestra de la mucosa gástrica tomada por biopsia endoscópica en el décimo día de la inoculación (tomada de referencia 8, con permiso del autor).

Este día informó a su mujer de la autoinoculación. Ella le miró enojada y le mostró a sus cuatro hijos. Marshall hizo las paces al recordarle, con sentido del humor y muy serio, que la mayor parte de la comunidad científica aseguraba que la bacteria inoculada no era patógena. Inicia una cura de sales de bismuto y metronidazol durante catorce días. Las molestias desaparecen. En la tercera endoscopia realizada, al mes de finalizado el tratamiento, la histología había recuperado la normalidad; las bacterias habían desaparecido (19).

CLASIFICACIÓN DEFINITIVA DE LA BACTERIA A LA ESPECIE *HELICOBACTER*

La nueva bacteria había sido incluida en la especie *Campylobacter* provisionalmente. Con los miembros del grupo compartía la morfología espiral, la capacidad de microaerofilia, el crecimiento en el mismo medio de cultivo y otras características bioquímicas. Difierían, sin embargo, en dos rasgos esenciales: la presencia de múltiples

flagelos en uno de los extremos (Figura 7) y su gran contenido en la enzima ureasa. El análisis comparativo con ME, de distintas bacterias espirales del género y de otras especies, el *Campylobacter pylori* mostraba mayor semejanza con el *Aquaspirillum*, miembro del género *Spirillum* (20).

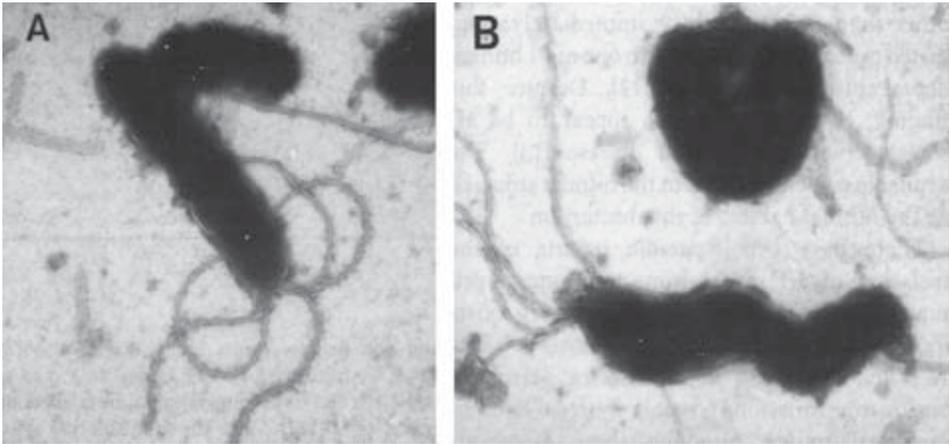


Figura 7. Morfología del *Helicobacter pylori*.

Un grupo de investigadores, aplicando el método de medida del porcentaje del contenido de guanina y citosina (GC) del DNA bacteriano, analizaron y compararon el contenido de GC en bacterias de la especie *Campylobacter* con el del *Campylobacter-like pylori* y con la del *Helicobacter*, recién descubierta por microbiólogos australianos en el intestino de corzos (21). Este método había sido utilizado, con gran eficacia, en la clasificación taxonómica de las bacterias, por investigadores de nuevas familias bacterianas. La proporción de GC, del 35-38% hallado en el *Campylobacter-like* fue más parecida a la del *Helicobacter* (22).

Otros microbiólogos, con técnicas de biología molecular, compararon la secuenciación del 16S RNA ribosómico del *Campylobacter pylori* con diferentes bacterias. Comprobaron la mayor semejanza con las bacterias espirales del género *Wolinella*, aunque diferían por su contenido de GC (23). Otros análisis estructurales bioquímicos, comparando ambas especies, demostraron que el *Campylobacter pylori* carecía de menaquinona-6, marcador bioquímico de la especie *Campylobacter* (24).

También, la utilización del método de medición del contenido de ácidos grasos por cromatografía líquida de gas (GLC) aplicado en la taxonomía de las bacterias, permitió completar la clasificación de la especie *Campylobacter* (25). Lo aplicaron al estudio del contenido de ácidos grasos del *Campylobacter pylori* con otros *Campylobacter*, obtuvieron resultados diferentes (26).

Finalmente, con la agrupación de datos del contenido de ácidos grasos por GLC y de los de hibridización DNA-DNA, comparados con los obtenidos en otras bacterias, un grupo de microbiólogos, liderados por Goodwin, demostraron que sus características morfológicas y estructura bioquímica eran más parecidas a la nueva especie *Helicobacter*. En 1989 publican un artículo en el que exponen los hechos que avalaron el cambio de nombre de *Campylobacter* a *Helicobacter pylori* (27). Desde entonces esta denominación ha sido reconocida y aceptada por la comunidad científica mundial.

IMPACTO DEL DESCUBRIMIENTO DEL *HELICOBACTER PYLORI* EN LA MEDICINA

El descubrimiento de la bacteria ha significado cambios importantes en las enfermedades gastroduodenales y, en menor medida, en algunas enfermedades extra-digestivas. Informaré de modo resumido.

NUEVA PATOGENIA DE GASTRITIS Y DE ÚLCERA PÉPTICA

Numerosos artículos informaban datos epidemiológicos de prevalencia de Hp en gastritis del 80%, en la forma multifocal de la clasificación de Correa (28), al 100% en la tipo B o antral. La gastritis multifocal suele asociarse a UG y la antral a UD (15, 29, 30).

¿Cómo explicar el mecanismo causal del Hp para originar la UP? Dos datos apoyaban la hipótesis: uno epidemiológico y otro clínico. El primero demostraba la asociación de Hp con UD en casi el 100% de los pacientes y en el 80-95% de las úlceras gástricas. El clínico: los pacientes tratados con fármacos antiseoretos cicatrizaban la úlcera, pero recidivaban al cabo de los doce meses hasta el 100%.

Mientras que al añadir antibióticos o sólo con ellos para curar la infección, la UP no reactivaba (32, 33).

¿Cómo integrar los dos agentes Hp y Ph (ácido) en la patogenia de la UP?

Varios estudios de la mucosa duodenal en ulcerosos gástricos demostraron la existencia de mucosa gástrica en el bulbo o metaplasia gástrica (MG), la inflamación de la mucosa o duodenitis y la presencia de la bacteria Hp en la mucosa del bulbo duodenal en las proximidades de la MG (29, 35). La hipoclorhidria de la gastritis aguda mejoraba espontáneamente, alcanzando la normosecreción y la hiperclorhidria, cuando la infección se cronificaba. La reacción inflamatoria de la mucosa gastroduodenal genera mediadores inflamatorios y reducción de la hormona somatostatina que causan hipergastrinemia (35, 36). La Figura 8, emitida por la Comisión Nobel, muestra los procesos y etapas del Hp para causar gastritis y UP simple y complicada, desde su penetración en el estómago. Señala la localización e infección predominante en el antro gástrico; la inflamación crónica o gastritis, que suele ser asintomática; el aumento de acidez gástrica, la UP y sus complicaciones.

MODIFICACIÓN DEL CONCEPTO DE GASTRITIS. EVOLUCIÓN E HISTORIA NATURAL DE LA GASTRITIS POR *HELICOBACTER PYLORI*

Un grupo de investigadores, clínicos y básicos, acuerdan establecer una clasificación con criterios endoscópicos, topográficos, histopatológicos y etiológicos denominada clasificación de Sydney (31). Desde entonces los patólogos examinan las preparaciones de tejido de mucosa gástrica con estos criterios y consideran el aspecto dinámico de la lesión inflamatoria que puede evolucionar a UP, carcinoma y linfoma gástrico en relación con factores genéticos y ambientales.

La asociación de infección Hp con el desarrollo del carcinoma gástrico fue demostrado por estudios epidemiológicos de prevalencia y caso-control (37, 38). Aunque faltaban datos experimentales, los datos epidemiológicos fueron tan demostrativos que, en 1994, la Organización Mundial de la Salud, declaró al Hp, agente cancerígeno

tipo I (39). Posteriormente, se logró desarrollar carcinoma gástrico en el animal de experimentación Gerbo morgoliano infectado con *Helicobacter pylori* (40).

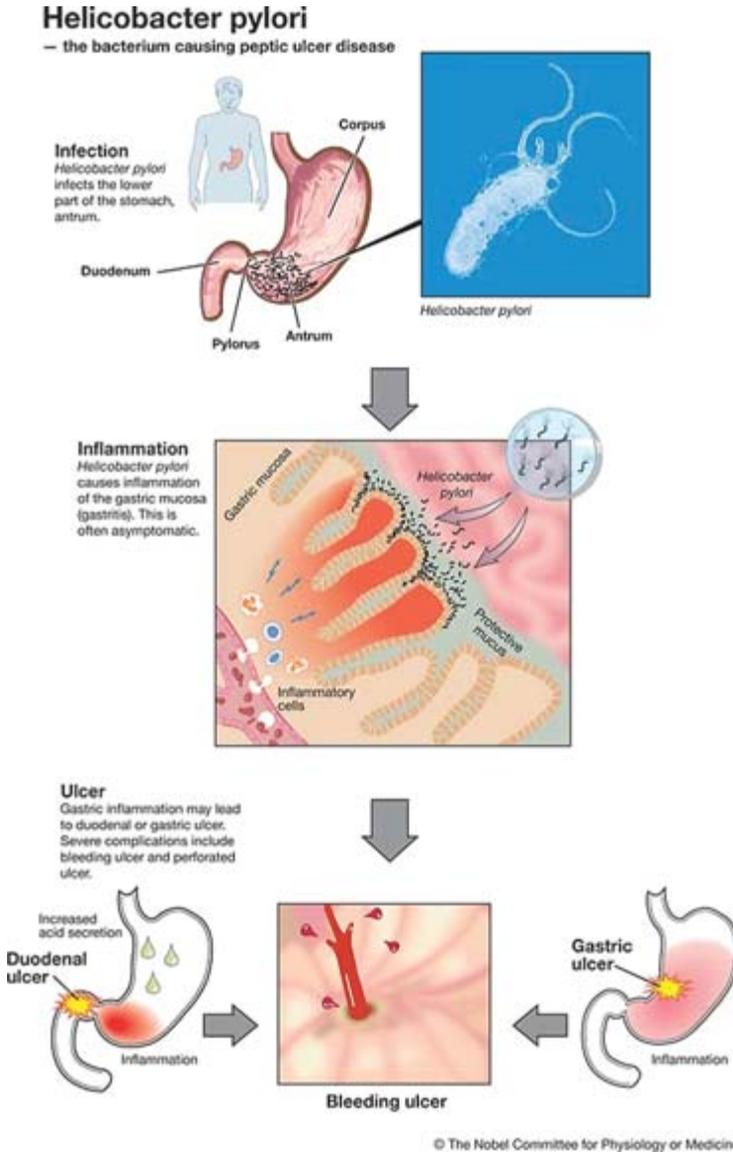


FIGURA 8. Esquema del mecanismo patogénico de la infección por *Helicobacter pylori*.

Igualmente, estudios epidemiológicos demostraron la prevalencia de hasta el 100% de infección Hp en linfomas gástricos, tipo MALT de baja penetración (41). La curación de la infección eliminó el tumor (42).

Estos datos completaban las posibilidades evolutivas de la gastritis por Hp, su **Historia natural** desde la primoinfección. La Figura 9 resume la evolución potencial desde la primoinfección del Hp en la mucosa gástrica. La primera lesión es gastritis superficial que puede progresar a atrofia, Metaplasia Intestinal (MI) y displasia. El siguiente paso evolutivo es la transformación carcinomatosa. Este ciclo ocurre sólo en algunos pacientes. Otros agentes cancerígenos ambientales dietéticos complementan la acción del Hp. La otra línea evolutiva es el desarrollo de UD y de UG. En el primer caso, la gastritis suele afectar al antro. La capacidad de producción de ácido clohídrico queda intacta o aumentada que también pudiera contribuir a la patogenia.

La evolución a linfoma, posiblemente, venga determinada por el tipo de gastritis inicial, con gran infiltrado linfocitario, asociada a factores genéticos, aún desconocidos.

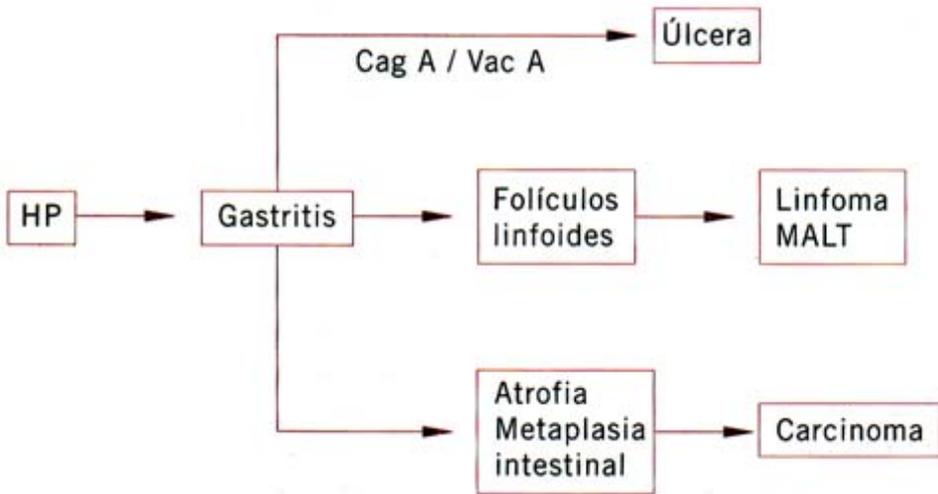


FIGURA 9. Esquema de la historia natural de la infección *H.pylori*.

MODIFICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO Y TERAPEÚTICA DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

La consistencia de los hechos que probaron la relación de la infección Hp con la gastritis, UD y UG, Carcinoma y linfoma gástrico, decidieron el uso de nuevos métodos diagnósticos y pautas terapéuticas. Los **métodos diagnósticos** fueron orientados a identificar la bacteria: en biopsia gástrica endoscópica: Histología, cultivo y ureasa rápido. Sin necesidad de endoscopia: la serología, la prueba de aliento con urea marcada, la determinación de antígenos en heces facilitaba el diagnóstico. El de mayor especificidad es el cultivo, pero es el menos sensible. La prueba de aliento, con urea marcada, es muy sensible y específica y la preferida de pacientes. Consiste en marcar la urea con C14, radioactivo o con C13, isótopo estable. El marcador C14 no alcanzó difusión por el riesgo de los pacientes, aunque mínimo. El marcaje con isótopo estable C13, ideado por Graham y Klein en 1987 y denominado «Urea Breath Test» (prueba o test de aliento), asienta en la reacción, que la ureasa del Hp activo y presente en la mucosa gástrica desarrolla sobre la solución de urea marcada con C13 ingerida (42). La ureasa desdobra la urea en amoníaco, agua y ^{13}CO , que se expulsa con el aire expirado. Con diversas variantes metodológicas para facilitar su aplicación, esta prueba es la más aceptada por los pacientes, por la carencia de efectos adversos, su excelente tolerancia, su gran sensibilidad y especificidad (95-98%) y por la facilidad de realización. La indicación preferente es la comprobación de la eficacia del tratamiento.

El **tratamiento** de la UP ha experimentado un cambio sustancial: de disminuir la secreción gástrica a curar la infección Hp. Las modernas pautas terapéuticas combinan antiseoretos potentes de la familia de Inhibidores Bomba de protones con dos antibióticos (amoxicilina y claritromicina o un compuesto nitroimidazólico) en el régimen primero de inducción. Con esta asociación se consigue la curación en el 80-90% de los pacientes (44). La inclusión de IBP beneficia a los pacientes, precozmente porque alivia o suprime el dolor, casi de forma inmediata. Con lo que se consigue cumplir los criterios ideales del tratamiento antiulceroso: Suprimir el dolor, cicatrizar y evitar las recaídas o recidivas de la UP si se obtiene la curación de la infección con los antibióticos. En los que no se logra la curación, un cambio de

antibiótico, la adición de un tercero, la combinación con sales de Bi logra la curación en la casi totalidad de los tratados (45).

En resumen, Warren y Marshall demostraron la patogenicidad del Hp, rompiendo con las creencias tradicionales. Ambos eran intuitivos. Marshall unía a estas cualidades valentía, sentido del humor y desparpajo para enfrentarse a situaciones inesperadas para convencer a un auditorio escéptico. Sin entrar en valoraciones comparativas del grado de aportación de cada uno al descubrimiento, la de Warren fue cualitativa y esencial. Sin embargo, sin el trabajo de Marshall, sin su decisión valiente, tal vez poco responsable de autoinocularse y sin su continua y absoluta entrega a la causa del Hp, dedicando todos sus esfuerzos, posiblemente la relación de la infección con las lesiones inflamatorias, con sus consecuencias de diagnóstico y tratamiento, no hubieran sido aceptadas por la comunidad médica y científica.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) PRESS RELEASE: *The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. 3 October 2005. Nobelprize.org.
- (2) WARREN, J. R. (1983): «Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis». *Lancet* 1: 1273.
- (3) MARSHALL, B. (1983): «Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis». *Lancet* 1: 1273-4.
- (4) WARREN, J. R. (2002): «The discovery of *Helicobacter pylori* in Perth, Western Australia. En *Helicobacter Pioneers* (Firsthand account from the scientists who discovered *Helicobacters*. 1892-1982)». B. Marshall (ed.) Blacwell Science Asia, 151-164.
- (5) ALLEN, PIN (2001): «What's the story H *Pylori*?» (Feature). *Lancet* 1: 694.
- (6) WHITEHEAD, R.; TRUELOVE, S. C., GEAR, W. M. L. (1972): «The histological diagnosis of Chronic gastritis in fiberoptic gastroscopie biopsy specimens». *J Clin.Pathl.* 25: 1-11.
- (7) FUNG, W. P.; PAPADIMITRIU, J. M., MATZ, L. R. (1979): «Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis». *Am. J. Gastroenterol.* 71: 269-79.
- (8) MARSHALL, B. J. (2002): «The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. En *Helicobacter Pioneers* (Firsthand account from the scientists who discovered *Helicobacters*. 1892-1982)». B. Marshall (ed.). Blacwell Science Asia, 165-202.

- (9) MARSHALL, B. J. (1989): «History of the discovery of *C. Pylori*». In *Campylobacter pylori* in gastritis and Peptic Ulcer Disease. M. J Blaser (ed). Igaku-Shoin. New York, Tokio, 7-23.
- (10) WIERSINGA, W. M., TYTGAT, G. N. (1977): «Clinical recovery owing to parietal cell failure in a patient with Zollinger-Ellison syndrome». *Gastroenterology* 73: 1413-1417.
- (11) RAMSEY, E. J.; CAREY, K. V.; PETERSON, W. L., et al. (1979): «Epidemic gastritis with acholrhidria». *Gastroenterology* 76: 1449-1457.
- (12) MAGNUS, H. A. (1952): «Gastritis». In Jones, F. A. (ed). *Modern Trends in Gastroenterology*. London: Buterworth, 323-51.
- (13) MARTÍN, D. F.; HOLLANDERS, D.; MAY, S. J., et al. (1981): «Differences in relapse rates of duodenal ulcer after healing with cimetidina or tripotassium dicitrato bismuthate». *Lancet* 1: 7-10.
- (14) GREGORY, M. A.; MOSHAL, M. G., SPITAEELS, J. M. (1982): «The effect of tripotassium di-citrato bismuthate on the duodenal mucosa during ulceration. An ultrastructural study». *S Afr Med J.* 62: 52-5.
- (15) MARSHALL, B. J., WARREN, J. R. (1984): «Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration». *Lancet* 1: 1311-15.
- (16) McNULTY, C. A., WATSON, D. M. (1984): «Spiral bacteria of the gastric antrum». *Lancet* 1: 1068-9.
- (17) LANGEBERG, W.; TYTGAT, G. N.; SHIPPER, M.E., et al. (1984): «*Campylobacter*-like organism in the stomach of patients and healthy individuals». *Lancet* 1: 1348-9.
- (18) ELDRIDGE, J.; LESSELS, A. M., JONES, D. M. (1984): «Antibody to spiral organisms on gastric mucosa». *Lancet* 1: 1237.
- (19) MARSHALL, B. J.; ARMSTRONG, J. A.; MCGECHIE, D. B., GLANCY, R. J. (1985): «Attempt to fulfill Koch's postulates for *pyloric Campylobacter*». *Med J Aust* 142: 436-9.
- (20) JONES, D. M.; CURRY, A., FOX, A. J. (1985): «An ultrastructural study of the gastric *Campylobacter*-like organism "*Campylobacter pyloridis*"». *J Gen Microbiol* 131: 2335-41.
- (21) DAVIS, C. P.; CLEVEN, D.; BROWN, J., BALISH, E. (1976): «*Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria». *Int J Syst Bacteriol* 26: 498-504.
- (22) BEJL, A.; MEGRAUD, F., VINCENT, P. et al. (1988): «GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging to the genus *Campylobacter*». *Ann Inst Pasateur/Microbiol* 138: 527-34.
- (23) THOMPSON, L. M.; SMIBERT, R. M.; JOHNSON, J. L., KRIEG, N. R.: «Phylogenic study of the genus *Campylobacter*». In *J Syst Bact* 1988; 38: 109-200.
- (24) LAMBERT, M. A.; PATTON, C. M.; BARRET, T. J., MOSS, C. W. (1987): «Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acid composition». *J Clin Microbiol* 25: 706-13.
- (25) HAZELL, S. L. (1991): «Microbiology and taxonomy of *Helicobacter pylori* and related bacteria». En: *Helicobacter pylori* in peptic ulceration and gastritis. BJ Marshall, R., McCallum, R. L. Guerrant (Edts.). Boston Blackwell Scientific Publications, 19-34.

- (26) GOODWIN, C. S.; MCCONNELL, C., MCCULLOCH et al. (1989): «Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other *Campylobacters*». *J Clin Microbiol* 27: 938-43.
- (27) GOODWIN, C. S.; AROMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T., et al. (1989): «Thansfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively». *Int J Syst Bacteriol* 39: 397-405.
- (28) CORREA, P. (1988): «Chronic gastritis: A clinico-pathological classification». *Am J Gastroentrol* 83: 504-509.
- (29) JOHNSTON, B. J.; REED, P. I., ALI, M. H. (1986): «*Campylobacter*-like organisms in duodenal and antral endoscopic biopsies: Relationship to inflammation». *Gut* 27: 1132-1137.
- (30) JIANG, S. J.; LIU, W. Z.; ZHANG, D. Z., et al. (1987): «*Campylobacter*-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric carcinoma». *Scand J Gastroentrol* 22: 553-558.
- (31) MISSIEWIEZ, J. J.; TYTGAT, G. N. J.; GOODWIN, C. S., et al. (1991): «The Sidney system: a new classification of gastritis». *J Gastro Hepato.* 6: 207-52.
- (32) COGHLAN, J. G.; GILLIGAN, D.; HUMPHRIES, H., et al. (1987): «*Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers-a 12 month follow-up study». *Lancet* ii: 1109-1110.
- (33) RAWES, E. A. J., TYTGAT, G. N. J. (1990): «Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *H pylori*». *Lancet* 335: 1233.
- (34) WYAT, J. I.; RATHBONE, B. J.; DIXON, M. F., et al. (1987): «*Campylobacter pyloridis* and acid-induced gastric metaplasia in the pathogenesis of duodenitis». *J Clin pathol* 40: 841-848.
- (35) CRABTREE, J. E.; SHALLROSS, HEATLEY, R. V., et al. (1991): «Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6- in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis». *Gut* 32: 1473-7.
- (36) MOSS, S. F.; LEGON, S.; BISHOP, A. E., et al. (1992): «Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease». *Lancet* 340: 930-32.
- (37) PARSONNET, J.; FERDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P., et al. (1991): «*Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma». *New Eng J Med* 325: 1127-1131.
- (38) NOMURA, A.; STEMMERMAN, G. N.; CHYOU, P. H., et al. (1991): «*Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii». *New Eng J Med* 325: 1132-1136.
- (39) IARC: «Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risks to Human». Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cáncer. Lyon 1994.
- (40) WATANABE, T.; TADA, M.; NAGAI, H., et al. (1998): «*Helicobacter pylori* induces gastric cancer in mongolian gerbils». *Gastroenterology* 115: 642-648.
- (41) WOTHERSPOON, A. C.; ORTIZ-HIDALGO, C.; FALZON, M. R., ISSACSON, P. G. (1991): «*Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma». *Lancet* 338: 1175-1176.

- (42) WHITHERSPOON, A. C.; DOGLIONI, C.; DISS, T. C., et al. (1993): «Regression of primary low-grade B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*». *Lancet* 342: 575-577.
- (43) GRAHAM, D. Y.; KLEIN, P. D.; EVANS, D. J., et al. (1987): «*Campylobacter pylori* detected noninvasively by the 13C-urea breath test». *Lancet* i: 1174-7.
- (44) PAJARES, J. M. (2000): «The treatment of *Helicobacter pylori* infection: General aspects and the therapy regimens». In *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal lesions. The second decade. Pajares, J. M.; Correa, P., Pérez Pérez, G. (Edtrs.). *Prous Science*. Barcelona, pp. 225-235.
- (45) EUROPEAN *HELICOBACTER PYLORI* STUDY GROUP (1997): «Current concepts on the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus». *Gut* 41: 8-13.

Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia: mecanismos moleculares del transporte de glicina en las sinapsis glutamatérgicas

Recibido el 6 de febrero de 2006

BEATRIZ CUBELOS*, CECILIO GIMÉNEZ Y FRANCISCO ZAFRA
*Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», Facultad de Ciencias,
Universidad Autónoma de Madrid, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Madrid, España*

RESUMEN

Durante los últimos años, se han obtenido evidencias que relacionan la hipofunción del receptor de glutamato tipo NMDA (NMDAR) con la esquizofrenia. Los receptores NMDA necesitan para su estimulación la unión conjunta tanto de glutamato como de glicina, ya que ambos poseen en el receptor un sitio de unión específico. Puesto que la inhibición farmacológica de GLYT1 aumenta los niveles de glicina en los alrededores del receptor de glutamato tipo NMDA estimulando su función, el transportador de glicina GLYT1 representa una de las dianas terapéuticas más prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos. Previamente hemos demostrado que GLYT1 se encuentra físicamente asociado con NMDAR a través de la proteína de adaptadora PSD-95 en neuronas glutamatérgicas. El objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la interacción de GLYT1 con otras proteínas, especialmente con aquellas que también interaccionan con el

* Extracto del trabajo de investigación original que obtuvo el Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia del año 2005.

Dirección de correo electrónico: bcubelos@cnb.uam.es

Abreviaturas utilizadas: GLYT1, Transportador de glicina 1; GST, glutathione-S-Transferase; MAGUK, membrana-associated guanylate kinase; NFPS, N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil-sarcosina; PBS, phosphate-buffered-saline; PDZ, PSD95/Dlg/ZO-1 homology domain; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacilamide gel electrophoresis; WB, western blot.

receptor de glutamato tipo NMDA. Hemos encontrado que GLYT1 interacciona con el tricomplejo heterotrimérico Mint-MALS-CASK. Este complejo está implicado en el transporte polarizado del receptor del glutamato tipo NMDA al terminal postsináptico. Puesto que GLYT1 interacciona simultáneamente con NMDAR y con el complejo Mint-MALS-CASK, proponemos que NMDAR y GLYT1 son cotransportados al terminal sináptico, así en todo momento NMDAR puede ser regulado por GLYT1. Estos resultados refuerzan la importancia de GLYT1 en la regulación de NMDAR y su potencial como blanco de acción de fármacos antipsicóticos.

Palabras clave: Tráfico intracelular.—NMDAR.—Dominios PDZ.—Interacción proteína-proteína.

ABSTRACT

Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: molecular mechanisms of glycine transport in glutamatergic synapses

During the last few years, evidence has been obtained for a relationship between hypofunction of the NMDA type of glutamate receptor and schizophrenia. The glycine binding site on NMDAR and the glycine transporter GLYT1 represent some of the most promising therapeutic targets for developing new anti-schizophrenic drugs. Pharmacological inhibition of GLYT1 increases glycine levels in the surrounding of NMDAR and stimulates its function. Previous studies performed indicated that GLYT1 is physically associated with NMDAR, through the scaffolding protein PSD-95, due to the common interaction of both GLYT1 and NMDAR with PDZ domains of PSD-95. The objective of this research was centred on the study of the interaction of GLYT1 with other PDZ proteins, in special those that also interact with NMDAR. Particularly, we were interested the heteromeric tricomplex Mint-MALS-CASK. We analyzed the structural basis of these interactions and the functional consequence on GLYT1 in aspects such as the intracellular traffic, the turnover on the cell surface and the inclusion in specific microdomains of the membrane. In this way we analyzed the possible existence of common steps in GLYT1 and NMDAR processing. To do that we used molecular and cellular biology techniques, such as cotransfections in cellular systems of DNA constructs obtained by site directed mutagenesis and immunoprecipitations.

Key words: Intracellular traffic.—NMDAR.—PDZ domains.—Protein-protein interactions.

INTRODUCCIÓN

Regulación de los niveles de glicina en la sinapsis glutamatérgica: Transportador de glicina de alta afinidad.

La glicina es necesaria, junto con el glutamato, para la activación de los NMDARs, pero durante mucho tiempo ha existido una polémica importante sobre el papel fisiológico de la misma en la sinapsis glutamatérgica. Esto se debió al hecho de que la afinidad del sitio de glicina es tan alta que muchos autores pensaron que estaría tónicamente saturado a las concentraciones de glicina habituales en la hendidura sináptica (1). Sin embargo, cálculos teóricos basados en las propiedades electrofisiológicas de los transportadores de glicina indicaban que estas proteínas podrían reducir la concentración de glicina en el emplazamiento local del NMDAR hasta una concentración de 1 μM o menos, es decir, hasta niveles no saturantes (2). Esta posibilidad se ha visto reforzada por estudios funcionales recientes que muestran que el compuesto N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi) propil-sarcosina (NFPS), un inhibidor específico del transportador de glicina GLYT1, potencia las respuestas mediadas por NMDA tanto *in vitro* como *in vivo* (3, 4).

El transportador de glicina GLYT1 se encuentra óptimamente localizado para regular la concentración de glicina en el microentorno de NMDAR, puesto que en cerebro de rata se ha observado una colocalización de la forma neuronal de GLYT1 con marcadores de las sinapsis glutamatérgicas (5). De hecho, GLYT1 está físicamente asociado a NMDAR como han demostrado experimentos de inmunoprecipitación.

En vista de esta asociación entre GLYT1 y la función de NMDAR, no es sorprendente el que este transportador se haya convertido en una diana importante para el desarrollo de fármacos antiesquizofrénicos. La idea básica de estos estudios es la de incrementar la actividad del receptor de NMDA, disminuida en los pacientes esquizofrénicos, mediante el incremento de la concentración extracelular de glicina que ha de producirse tras la inhibición del transportador. De hecho, varios estudios preclínicos recientes con los inhibidores de GLYT1 NFPS y ORG 24598 apuntan en esa dirección (6). Además, un estudio clínico con el inhibidor de GLYT1 sarcosina ha revelado

una mejora sustancial tanto de los síntomas positivos como de los negativos y cognitivos de los pacientes esquizofrénicos (7).

De lo anteriormente expuesto se desprende que el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la llegada de GLYT1 a las sinapsis glutamatérgicas y su interacción con NMDAR (por ejemplo, tráfico intracelular, reciclaje en la superficie celular e inclusión en microdominios en los que reside NMDAR) pueden ser de gran interés en la comprensión de la regulación no sólo de GLYT1 sino también de NMDAR y, por tanto, de interés en el contexto de la esquizofrenia.

Papel de las proteínas con dominios PDZ en la organización de la sinapsis

Las uniones sinápticas son estructuras altamente especializadas para poder transmitir eficientemente la señal de la neurona presináptica a la postsináptica. En el botón postsináptico existe una zona activa electrodensa denominada densidad postsináptica (PSD) formada por diversas proteínas, como los filamentos de actina y las proteínas de «andamiaje» que juegan un papel importante en la organización, estructura y función de las uniones sinápticas. Muchas de las proteínas de este complejo multiproteico poseen un motivo estructural común: los dominios PDZ (Figura 1).

Un importante ejemplo de este tipo de proteínas PDZ es el tricomplejo heteromérico descrito por primera vez en *C. Elegans* formado por LIN2, LIN7 y LIN10 y sus homólogos en mamíferos, denominados CASK/PALS, VELI/MALS y Mint/X11, respectivamente (8). Todas ellas tienen dominios PDZ y están implicadas en otros procesos celulares como la distribución polarizada de proteínas o la endocitosis y el reciclaje de las mismas. El tricomplejo está implicado en funciones tales como el transporte de vesículas y la localización subcelular del receptor NMDA (9). En dendritas, el dominio PDZ de MALS se une a través del extremo Ct de la subunidad NR2B del receptor de NMDA, mientras que el dominio PDZ de MINT1 se une a la proteína KIF17, de la superfamilia de las kinesinas que gracias a su interacción con los microtúbulos, actuaría como motor para llevar a las vesículas cargadas con NMDAR hasta las espinas dendríticas (10).

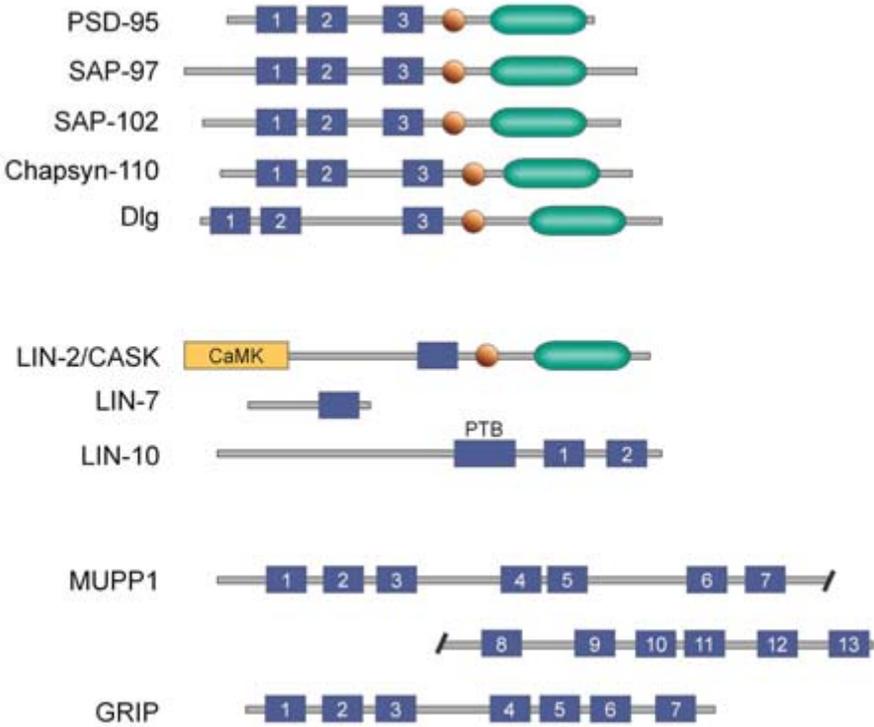


FIGURA 1. Esquema de algunas proteínas sinápticas que poseen dominios PDZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcciones de ADNc

Las construcciones de ADNc se llevaron a cabo mediante el método de mutagénesis dirigida por técnicas de PCR.

Detección de las interacciones de GLYT1 con dominios PDZ

La detección de las interacciones de GLYT1 con dominios PDZ de diferentes proteínas, se realizó utilizando una membrana comercial (TranSignal PDZ Domain Arrays de BioCat, Panomics, Alemania).

El extracto bacteriano que contenía la proteína His-GLYT1_{Ct} obtenido según lo indicado en el apartado anterior, se diluyó 1:1 en solución de resuspensión y se incubó con una membrana de Inmovilon que previamente había sido bloqueada. Tras una incubación de una hora con el extracto proteico, la membrana se lavaba y pasaba a ser incubada con un anticuerpo secundario dirigido contra la cola de histidinas. Tras los oportunos lavados, la presencia de His-GLYT1_{Ct} se visualizó mediante un procedimiento de quimioluminiscencia (ECL). Las soluciones de bloqueo, resuspensión y lavado utilizadas en el ensayo, fueron proporcionadas por el fabricante.

Cultivo y transfección de células COS-7

La línea celular COS-7 se cultivaban en DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10% y se mantenían a 37° C y 7 % de CO₂. Las células se plaqueaban al 50% de confluencia un día antes de ser transfectadas. La transfección se realizaba con Lipofectamina Plus (Gibco, USA). Las células eran incubadas con los complejos de lípidos y ADN en DMEM sin suero durante tres horas a 37° C y 7% de CO₂. Transcurrido este tiempo se añadía más medio de cultivo y suero bovino fetal hasta el 10%. Las células se utilizaban a las 48 horas de la transfección.

Ensayo de inmunoprecipitación

Las células COS-7 transfectadas o los sinaptosomas de cerebro de rata fueron solubilizadas en una solución de lisis (50 mM tris- HCl, pH 7,5, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA) durante 30 minutos a 4° C. Tras la centrifugación, el precipitado insoluble fue eliminado y los sobrenadantes incubados con los anticuerpos correspondientes durante dos horas, luego se adicionó 40 µl de una suspensión de bolas unidas a proteína A (Sigma) y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación rotatoria. Las bolas fueron lavadas con PBS frío cinco veces. Finalmente se añadieron 50 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se hirvieron durante cinco minutos para disociar la unión de las proteínas a las bolas y posteriormente se sometieron a electroforesis seguida inmunotransferencia como se ha describirá más adelante.

Ensayo de *Pull Down*

Las células COS-7 transfectadas con los vectores de expresión de las proteínas (PSD-95, MALS o Mint) se solubilizaron en 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA durante 30 minutos a 4° C. El material solubilizado obtenido tras centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos fue preincubado con 100 µl de bolas de glutatión agarosa al 50% (v/v) durante una hora con rotación en la noria a 4° C. Tras una centrifugación los sobrenadante se transferían a un tubo limpio y se incubaban con GST, GST-GLYT1Ct o GST-GLYT1Ctdel durante la noche con rotación constante a 4° C. Posteriormente, las bolas fueron lavadas con PBS frío tres veces y se les añadió 50 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se hirvieron durante cinco minutos para romper la unión de las proteínas a las bolas y luego se sometieron a una electroforesis seguida de inmunotransferencia.

Electroforesis y *Western Blot*

Tras la determinación de la concentración de proteínas en las muestras. La electroforesis se llevaba a cabo en gel de poliacrilamida y SDS, en condiciones reductoras, en presencia de 2-mercaptoetanol. Los geles se corrían lentamente durante la noche mediante una corriente constante de 30V. Tras la electroforesis, las muestras eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa por el sistema de electroblotting semi-seco (LKB) a 1,2 mA/cm² durante dos horas. La solución de transferencia que se usaba contenía 192 mM glicina y 25 mM Tris-HCl, pH 8,3.

La unión inespecífica a la membrana se bloqueó por incubación con 5% leche desnatada en 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, durante cuatro horas a 25° C. Posteriormente la membrana se incubó con el antisuero o anticuerpo purificado a la concentración idónea durante toda la noche a 4° C. Tras lavados con PBS la membrana se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y la banda se visualizó por el método de detección por quimioluminiscencia (ECL).

Producción de anticuerpos ANTI-GLYT1

Los anticuerpos policlonales se produjeron inmunizando conejos con la proteína de fusión Glutation-S-Transferasa que contenía los 37 aminoácidos del extremo amino terminal de GLYT1b para el anticuerpo número 224. La inmunización se realizó en conejos MDL Nueva Zelanda (Navarra, España), con proteína de fusión y el coadyuvante de Freund completo. Los conejos fueron reinmunizados cada dos semanas con la proteína de fusión que en esta ocasión había sido emulsionada con el adyuvante de Freund incompleto. Tras varias inmunizaciones se extrajeron los sueros y los anticuerpos se purificaron por columnas de afinidad (11). La proteína de fusión unida a GST y la propia proteína GST en una solución de Na-HEPES, pH 8,0 se acoplaron a columnas de Affi-Gel 15 siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero generado por el conejo contra la proteína de fusión se pasó en primer lugar por la columna que tenía adsorbida la proteína GST y posteriormente por la columna que contenía la proteína de fusión.

Biotinilación del anticuerpo ANTI-GLYT1

El anticuerpo anti-GLYT1 (número177) se biotiniló con 250 µg de éster de succinimida-biotina (Pierce, USA) por mg de anticuerpo.

Anticuerpos comerciales y cedidos

Los anticuerpos secundarios unidos a biotina o peroxidasa eran de Amersham y los unidos a fluoróforos eran de Molecular Probes. El anticuerpo anti-HA era de DABCO (Berkeley Antibody Company) y el anticuerpo anti-Myc fue cortésmente cedido por el laboratorio del Dr. Balbino Alarcón (CBM-SO). La detección de los miembros del complejo Mint/MALS/CASK se realizó mediante anticuerpos monoclonales de BD Transduction.

Experimentación con animales

En este estudio se ha trabajado con animales 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 1985: 86-23).

RESULTADOS

GLYT1 interacciona *in vitro* con una variedad de dominios PDZ

Dado que el extremo carboxilo terminal de GLYT1 posee un motivo de interacción con dominios PDZ, se decidió buscar nuevas proteínas que pudieran interactuar con el transportador. Para ello ensayamos la capacidad de interacción del extremo carboxilo terminal de GLYT1 con una matriz de dominios PDZ de diversas proteínas. Previamente se había preparado una construcción con los 77 aminoácidos del extremo C_t de GLYT1 clonados en fase con un péptido de seis histidinas. A esta construcción se le denominó His-GLYT1_{Ct}. La proteína se expresó en bacterias *E. Coli* (BL21). El extracto derivado de estas bacterias se incubó con la membrana en la que el fabricante había colocado por duplicado una serie de dominios PDZ (Figura 2A). Los puntos a los que se unió His-GLYT1_{Ct} fueron visualizados gracias a un anticuerpo dirigido contra la cola de histidinas, seguido de detección por quimioluminiscencia (Figura 2B). La intensidad de las señales se cuantificó mediante un análisis digital de las películas fotográficas (Figura 2C).

La interacción más fuerte se produjo con el tercer dominio PDZ de la proteína SAP-97. Sin embargo, no hubo reacción con el primer dominio PDZ de dicha proteína. Otras proteínas con las que se observó interacción fueron la Chapsina 110, a través de su segundo dominio, y MPP2 mediante su único dominio PDZ. La interacción también fue intensa con los dominios PDZ de RIL (reversion induced LIM protein) y moderada con OMP25 (Mitochondrial outer membrane protein 25). Únicamente el tercer dominio de PSD-95 estaba representado en la matriz comercial y presentó una interac-

ción específica pero débil. Se encontró también una interacción con los dominios PDZ de los miembros de la familia de proteínas Mint; en concreto, con el primer y segundo dominio de Mint1 y Mint3.

A

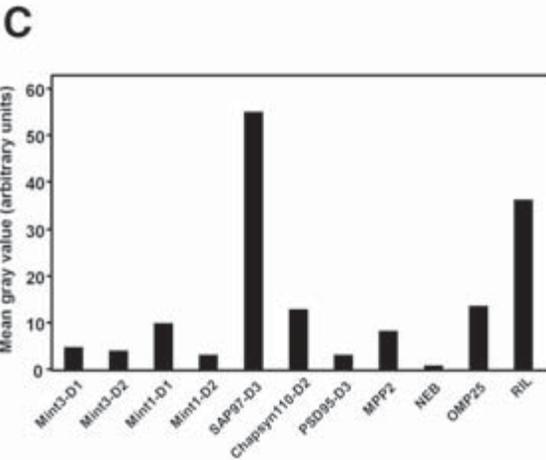
Mint2 D1	Mint3 D1	Mint3 D2	Mint1 D1	Mint1 D2	CSKP	SAP97 D1	SAP97 D3
Ch110 D2	PSD95 D3	DVL1	DVL3	DVLL	GIPC	HtrA2	LIMK2
MPP2	NEB1	OMP25	CLIM1	PTPH1	ZO2 D1	PTP1E D1	PTP1E D5
RSG12	RIL	ZO1 D3	ZO2 D3	GST			

FIGURA 2. Interacción del extremo carboxilo terminal de GLYT1 con dominios PDZ.

A) Esquema de la distribución de los dominios PDZ sobre la membrana de inmobilon. Cada dominio PDZ está representado por duplicado.



B) La membrana se incubó con un extracto de bacterias que expresan His-GLYT1ct. La unión de His-GLYT1ct a la membrana se detectó mediante un anticuerpo contra la cola de histidinas seguido de detección por quimioluminiscencia.



C) Cuantificación de la imagen obtenida en B mediante análisis digital con el programa «Scion Image».

Los valores se expresan como porcentajes de la interacción más fuerte, que correspondió al tercer dominio de SAP-97.

Para examinar con más detalle la posible interacción de GLYT1 con miembros de la familia Mint se transfectaron células COS con los vectores de expresión de las diferentes isoformas de Mint y con el vector de expresión de GLYT1, usándose como control el mismo vector sin inserto. De esta manera se observó que GLYT1 coimmunoprecipitaba con Mint2 y Mint3, no observándose banda en los controles de especificidad (Figura 3).

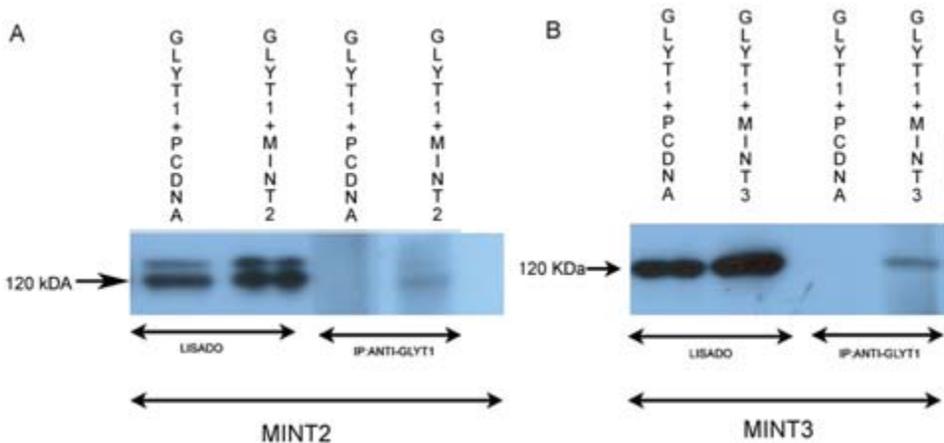


FIGURA 3. Co-inmunoprecipitación de miembros de la familia MINT y GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión de HA-Mint2, HA-Mint3, GLYT1 y/o vector de expresión pCDNA sin inserto como se indica en la figura. Sobre la fracción solubilizada en 0,5% Triton X-100 se realizó una inmunoprecipitación con anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se corrieron en un gel de electroforesis y se sometieron a inmunodetección con anticuerpos contra el epítipo HA, identificándose una banda de 120kDa, correspondiente a HA-Mint2 o HA-Mint3.

Estas interacciones se confirmaron mediante experimentos de «pull down» en los que la proteína de fusión que contiene los 74 aminoácidos finales del extremo carboxilo de GLYT1 unidos a GST había sido incubada con un lisado de células COS transfectadas con el vector de expresión de Mint2 o de Mint3. La proteína de fusión GST-GLYT1 precipitó tanto a Mint2 como a Mint3. El control de GST no fue capaz de precipitar a ninguno de los miembros de la familia Mint. También mediante este ensayo de «pull down» se caracterizó la importancia de la secuencia -SRI de GLYT1 en la interacción con Mint2 y Mint3, ya que al truncar la secuencia de interacción con dominios PDZ se produjo la desaparición de la interacción (Figura 4).

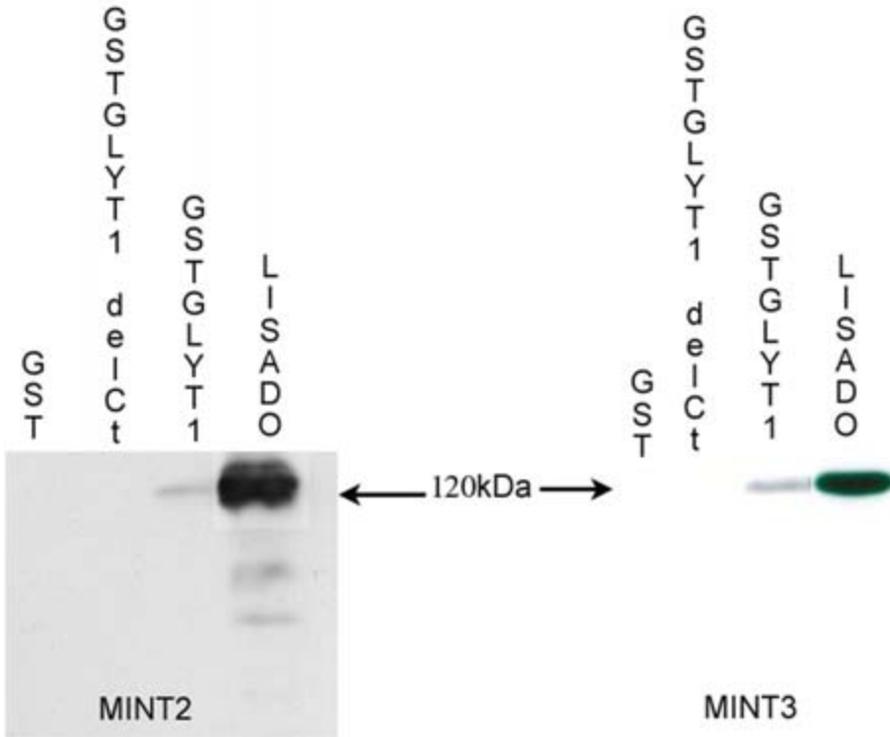


FIGURA 4. Ensayo de «pull down». Extractos de células COS transfectadas con los vectores de expresión para HA-Mint2 o HA-Mint3 fueron incubadas con GST (carril 1), con GST-GLYT1del-Ct (carril 2) o con GST-GLYT1-Ct (carril 3) durante una hora. Posteriormente se añadieron 50 μ l de glutatión agarosa durante una hora. La proteína acomplejada a las bolas se separó por centrifugación y tras lavados exhaustivos se analizó por electroforesis e inmunotransferencia. Como control de la eficiencia de transfección se analizaron en paralelo los lisados celulares correspondientes.

Una de las proteínas Mint, Mint-1, forma parte de un tricoplejo formado por Mint/MALS/CASK que ha sido implicado en el transporte polarizado de proteínas, en procesos de exocitosis de vesículas sinápticas y en la formación de complejos estables entre proteínas de andamiaje en las que participan dominios PDZ. Por este motivo decidimos estudiar también la posible interacción de GLYT1 con las distintas isoformas de MALS y con CASK. En el caso de MALS, se realizaron transfecciones en células COS con el vector de expresión de GLYT1 y los vectores de las diferentes isoformas de MALS.

Posteriormente, se realizó una inmunoprecipitación con anti-GLYT1 sobre la porción solubilizada en 0,5% Triton X-100 del extracto celular (Figura 5) y tras la inmunotransferencia se obtuvieron bandas inmunorreactivas para MALS1 y MALS2. Esta interacción no se observaba en controles que se habían transfectado con las isoformas de MALS junto con el vector de expresión carente de inserto. De igual modo, realizamos una inmunoprecipitación sobre el lisado de células COS que habían sido transfectadas con MALS y con una forma truncada de GLYT1 carente de los últimos tres aminoácidos en su extremo C_t. Tras un análisis por inmunotransferencia no se identificó coimmunoprecipitación, lo que confirma que la interacción ocurre a través del extremo Ct de GLYT1, que probablemente interaccione con el dominio PDZ de las proteínas MALS (Figura 6).

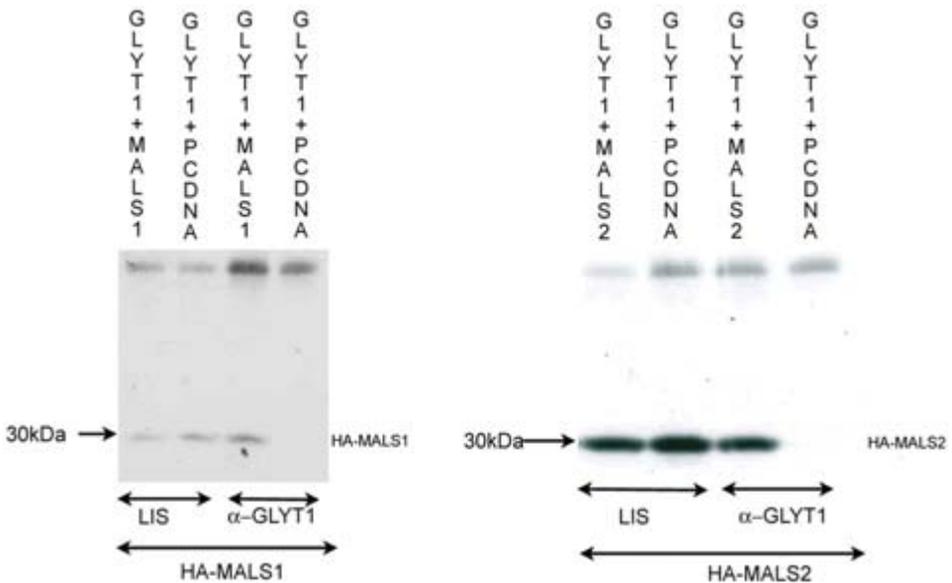


FIGURA 5. Co-inmunoprecipitación de MALS con GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión para HA-MALS1, HA-MALS2, GLYT1 y/o pCDNA como se indica en la figura. Posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron en un gel de electroforesis y se sometieron a inmunodetección con anticuerpos que reconocen el epítipo HA. Los carriles primero y segundo muestran los lisados, mientras que el tercero y cuarto muestran las inmunoprecipitaciones. Las proteínas MALS1 y MALS2 aparecen como bandas de 30 kDa que inmunoprecipita con anti-GLYT1 únicamente cuando se coexpresaron con el transportador.

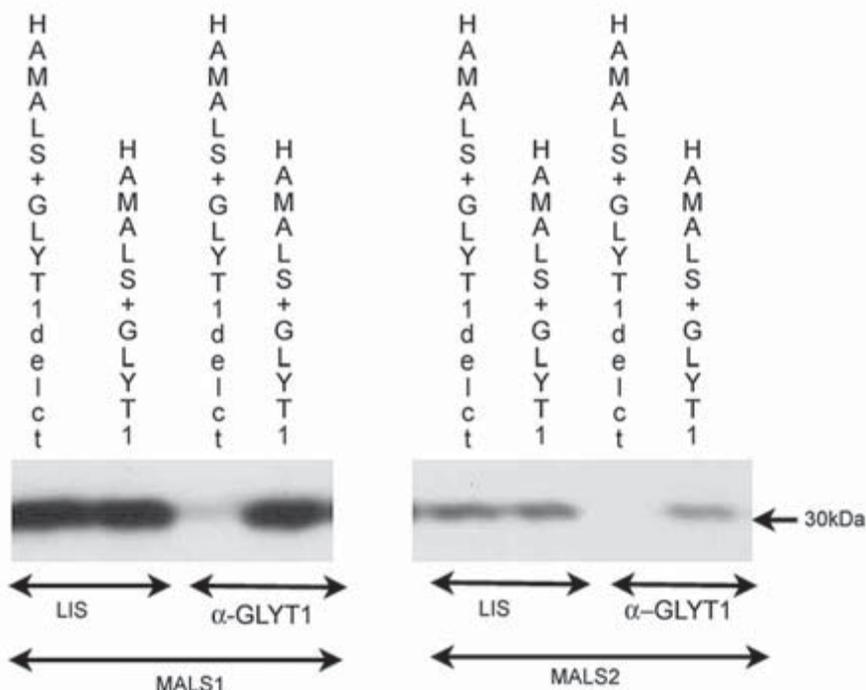


FIGURA 6. Co-inmunoprecipitación de miembros de la familia MALS con GLYT1. Células COS fueron transfectadas con los vectores de expresión para HA-MALS1, HA-MALS2, GLYT1 o GLYT1delCt (delección en la secuencia —SRI del extremo Ct de GLYT1—) como se indica en la figura. Posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis e inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen el epítipo HA. Los carriles primero y segundo muestran los lisados, mientras que el tercer y cuarto carril muestran las inmunoprecipitaciones. Las interacciones de HA-MALS1 y HA-MALS2 con GLYT1 desaparecen cuando se enfrentan con GLYT1 del Ct.

Sin embargo, en el caso de CASK, que pertenece a la familia MAGUK, no encontramos interacción directa, ya que cuando se coexpresó con GLYT1 no pudimos inmunoprecipitarla con anti-GLYT1. Para analizar la posible relevancia de la interacción de GLYT1 con estas proteínas en tejido cerebral realizamos experimentos de inmunoprecipitación en sinaptosomas derivados de cerebro de rata. Dichos sinaptosomas fueron solubilizados en 0,5% de Triton X-100, desechándose la parte insoluble e incubando la fracción soluble con anti-GLYT1. Los inmunoprecipitados se analizaron por

inmunotransferencia, identificándose una banda inmunorreactiva que se correspondía con el tamaño de Mint1 y Mint2 que no aparecía en el preinmune (Figura 7 A, B). También siguiendo la misma metodología se identificó la interacción entre GLYT1 y CASK (Figura 7 C). Estos datos apoyan la existencia de una interacción entre el transportador de glicina GLYT1 y el tricomplejo formado por Mint/MALS/CASK, que parece estar implicado en el proceso de tráfico intracelular de diversas proteínas y en su distribución asimétrica en células polarizadas.

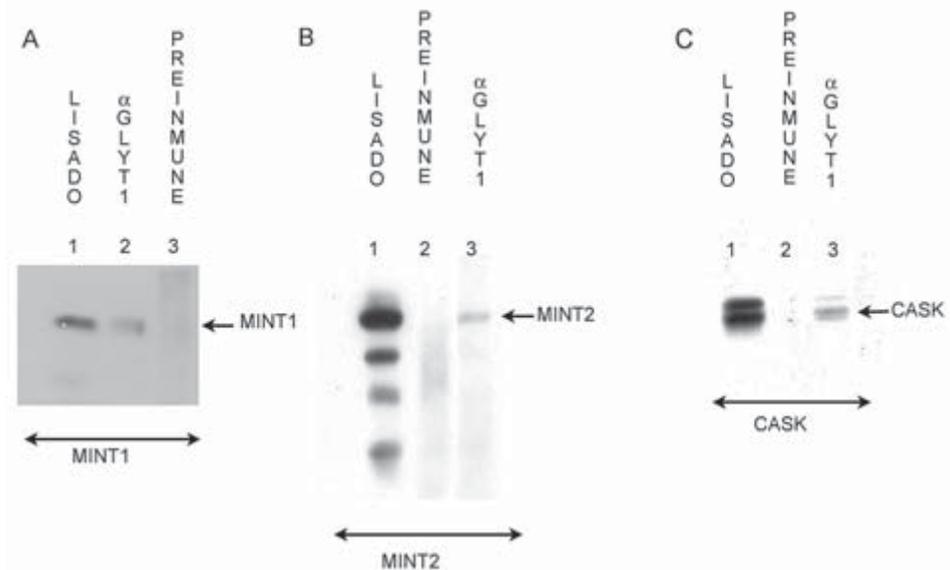


FIGURA 7. Co-inmunoprecipitación en sinaptosomas de MINT1, MINT2 y CASK con GLYT1. Sinaptosomas de cerebro de rata fueron solubilizados en 0,5% Triton X-100. La fracción solubilizada fue sometida a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GLYT1 (carril 3) o con suero preinmune (carril 2). Los inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis e inmunodetección con anticuerpos frente a MINT1 o a MINT2 o a CASK. Se observa que el anticuerpo anti-GLYT1 pero no el preinmune precipita una banda de 120kDa, en todos los casos coincide con la movilidad de la banda en los correspondientes lisados (carril 1).

DISCUSIÓN

El dominio PDZ es un motivo central en la organización de proteínas en la membrana plasmática. Las proteínas con dominios PDZ constituyen andamiajes moleculares en lugares específicos de las neuronas sobre las que se anclan tanto proteínas de membrana como proteínas reguladoras. GLYT1 posee en su extremo C₁ la secuencia Ser-Arg-Ile que se ajusta al tipo I de los motivos de interacción con PDZ (12, 13). Por ello, analizamos la interacción del extremo Ct de GLYT1 con una matriz de dominios PDZ de diferentes proteínas. Encontramos algunas proteínas que potencialmente podrían interactuar con GLYT1. De entre estas proteínas destacan los miembros de la familia Mint (Mint1, Mint2 y Mint3). La interacción de GLYT1 con miembros de la familia Mint se reprodujo en un sistema de expresión heterólogo en eucariotas y se confirmó la implicación del extremo C₁ de GLYT1 en la interacción.

Mint forma parte del complejo heterotrimérico Mint/MALS/CASK que desempeña un papel importante en el tráfico polarizado de proteínas en neuronas y en otras células polarizadas.

La interacción de GLYT1 con este complejo trimérico podría ser importante en la distribución asimétrica del transportador en células polarizadas. Este movimiento organizado del transportador podría estar controlado por las proteínas del complejo heterotrimérico que regulan el tráfico intracelular hasta la membrana plasmática.

En este estudio hemos presentado evidencias de la asociación de GLYT1 con miembros de la familia MINT y con CASK en sinaptosomas de cerebro de rata. Además hay que destacar la interacción *in vitro* detectada con los miembros de MALS.

Así confirmamos que GLYT1 es capaz de interactuar con los miembros del tricoplejo Mint/MALS/CASK. Estas interacciones sugieren que las proteínas con dominios PDZ pueden jugar un papel importante en aspectos básicos de la biología celular y molecular del transportador, como puede ser su distribución polarizada en las neuronas, su anclaje a las densidades postsinápticas o a otro tipo de microdominios multiproteicos en donde entraría en contacto de manera selectiva con los sistemas de transducción de señal que modularían su función.

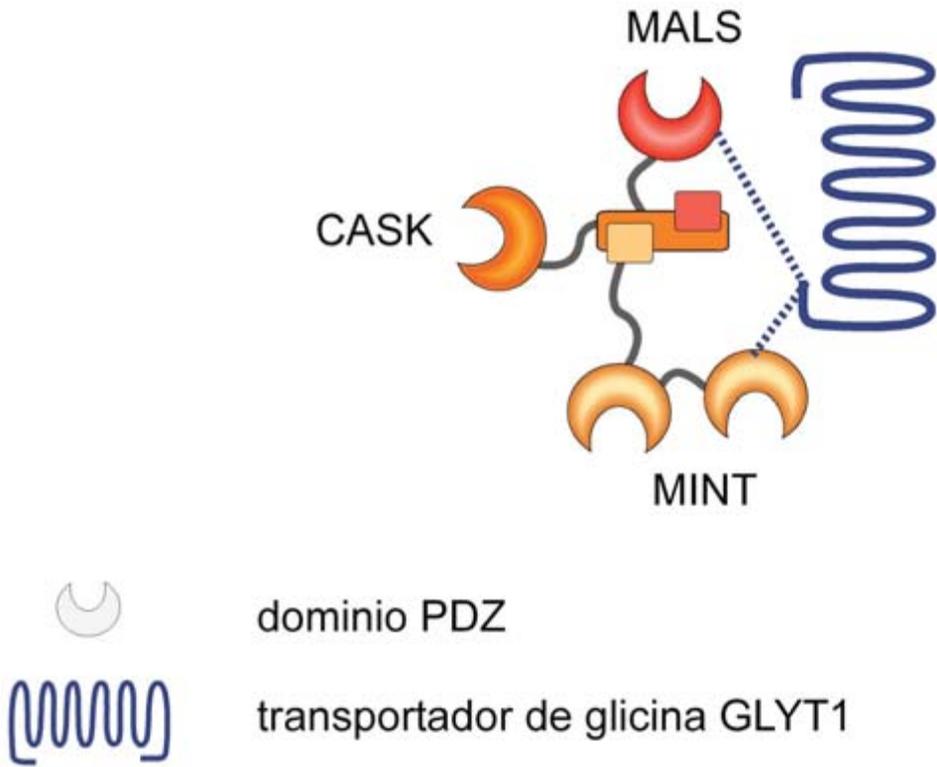


FIGURA 8. Representación del complejo trimérico Mint/MALS/CASK y de la interacción con GLYT1.

Se ha propuesto que el complejo heterotrimérico está implicado en el transporte, localización y anclaje del receptor de glutamato tipo NMDA; ya que se ha descrito una interacción entre el dominio PDZ de MALS y el extremo carboxilo terminal de una de las subunidades del receptor de glutamato tipo NMDA. Estos datos sustentan la existencia de mecanismos comunes para el tráfico intracelular de GLYT1 y el receptor de NMDA. El conocimiento de estos procesos puede ser importante para la comprensión de la función de los receptores de NMDA y del papel regulador que desempeña el transportador de glicina GLYT1 en la sinápsis glutamatérgicas, de forma que el transportador puede conseguir una posición óptima en la membrana plasmática para regular la concentración de glicina en el microentorno del receptor de glutamato tipo NMDA y modular así su función.

Además, recientemente se ha publicado que la glicina no solamente regularía la función del receptor de glutamato sino también su internalización desde la superficie celular (14). Aunque los NMDARs tienen tasas de internalización más lentas que otros receptores ionotrópicos, también sufren procesos de recambio que afectan a las propiedades de la neurotransmisión (15). Aparentemente, la internalización dependiente de glicina requiere mayores concentraciones del aminoácido de las que son necesarias para la apertura del canal. Así, mediante su capacidad para modular la concentración de glicina extracelular, el transportador de glicina GLYT1 podría regular no sólo la función del canal sino también los niveles de receptor NMDA en la superficie celular.

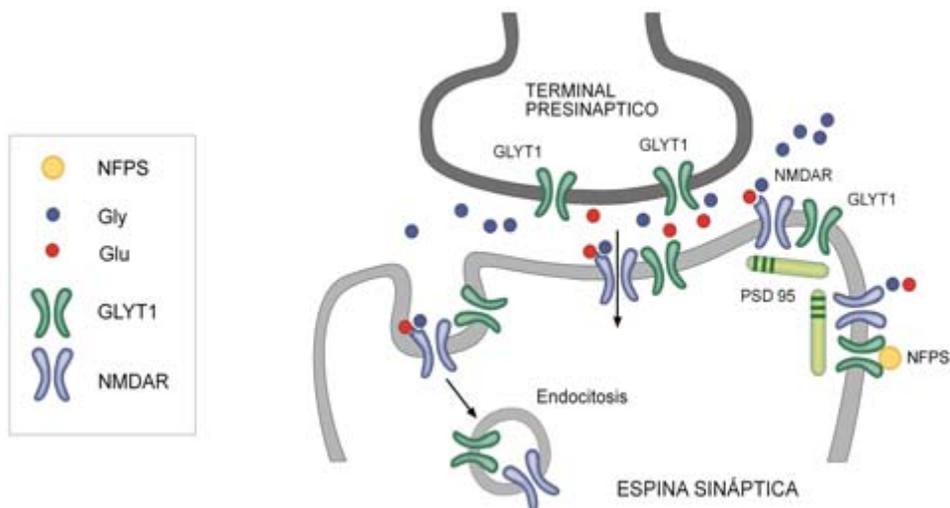


FIGURA 9. Representación de la asociación entre NMDAR y GLYT1

El estudio y la comprensión de la relación que existe entre el transportador de glicina GLYT1 y el receptor de glutamato tipo NMDA es de vital importancia para el esclarecimiento de la esquizofrenia.

Teniendo en cuenta la presencia de un motivo de interacción con dominios PDZ en el extremo carboxilo de GLYT1, es posible que GLYT1 interacte con otras proteínas PDZ con las que también

interacciona NMDAR, como hemos demostrado para el complejo heterotrimérico Mint/MALS/CASK. Nosotros proponemos que es la interacción con el tricomplejo Mint/MALS/CASK la responsable de aspectos tales como el tráfico intracelular, el recambio en la superficie celular y la incorporación al transportador de glicina GLYT1 a microdominios específicos de membrana. Además proponemos para este tricomplejo la responsabilidad de puntos comunes de regulación en procesos tales como su tráfico intracelular, su internalización o su interacción con vías de señalización para GLYT1 y NMDAR.

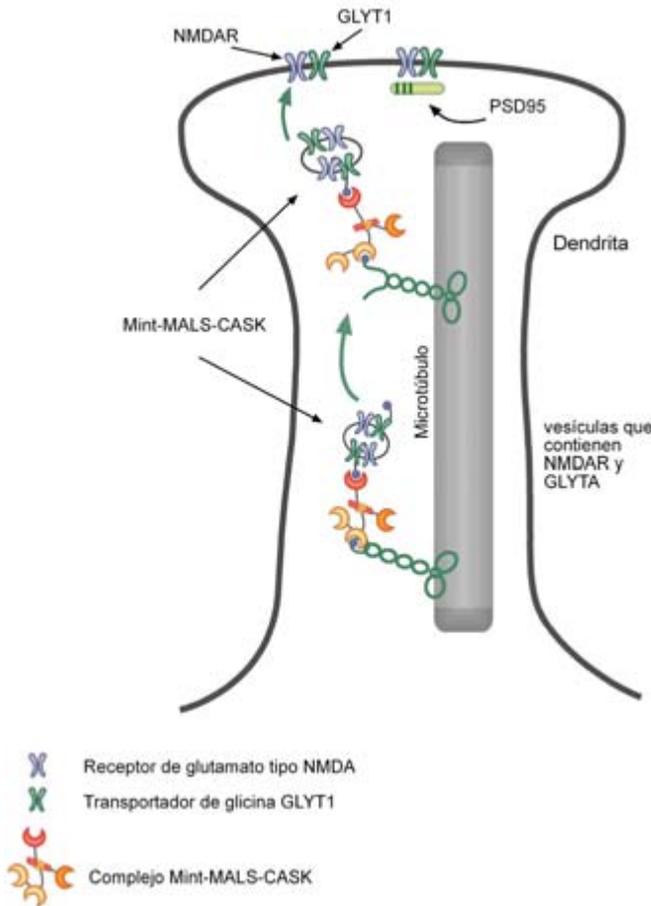


FIGURA 10. Hipótesis del tráfico intracelular común para GLYT1 y NMDAR.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a E. Núñez y G. Esteban su valiosa ayuda técnica. Este trabajo se ha realizado con el soporte económico de la Dirección General Española de Investigación Científica y Técnica (BMC2002-03502), Fondo de Investigaciones Sanitarias, Comunidad Autónoma de Madrid y Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) WESTERGREN, I.; NYSTROM, B.; HAMBERGER, A.; NORDBORG, C. y JOHANSSON, B. (1994): Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J. Neurochem.* 62: 159-165.
- (2) BERGERON, R.; MEYER, T. M.; COYLE, J. T. y GREENE, R. W. (1998): Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15730-15734.
- (3) CHEN, L.; MUHLHAUSER, M. y YANG, C. R. (2003): Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 89: 691-703.
- (4) KINNEY, G. G.; SUR, C.; BURNO, M.; MALLORGA, P. J.; WILLIAMS, J. B.; FIGUEROA, D. J.; WITTMANN, M.; LEMAIRE, W. y CONN, P. J. (2003): The glycine transporter type 1 inhibitor NFPS potentiates NMDA receptor-mediated responses *in vivo* and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J. Neurosci.* 23: 7586-7591.
- (5) CUBELOS, B.; GIMÉNEZ, C. y ZAFRA F. (2005): Localization at glutamatergic synapses of the glycine transporter GLYT1. *Cerebral Cortex* 15: 448-459.
- (6) LE PEN, G.; KEW, J.; ALBERATI, D.; BORRONI, E.; HEITZ, M. P.; MOREAU, J. L. (2003): Prepulse inhibition deficits of the startle reflex in neonatal ventral hippocampal-lesioned rats: reversal by glycine and a glycine transporter inhibitor. *Biol. Psychiatry.* 54: 1162-70.
- (7) TSAI, G.; RALPH-WILLIAMS, R. J.; MARTINA, M.; BERGERON, R.; BERGER-SWEENEY, J.; DUNHAM, K. S.; JIANG, Z.; CAINE, S. B. y COYLE, J. T. (2004b): Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8485-90.
- (8) BORG, J. P.; STRAIGHT, S. W.; KAECH, S. M.; DE TADDEO-BORG, M.; KROON, D. E.; KARNAK, D.; TURNER, R. S.; KIM, S. K. y MARGOLIS, B. (1998): Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J. Biol. Chem.* 273: 31633-31636.
- (9) MAXIMOV, A. y BEZPROZVANNY, I. (2002): Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22: 6939-6952.

- (10) SETOU, M.; NAKAGAWA, T.; SEOG, D. H. y HIROKAWA, N. (2000): Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802.
- (11) ZAFRA, F.; ARAGÓN, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N. C.; GIMÉNEZ, C. y STORM-MATHISEN, J. (1995): Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (12) SHENG, M. y SALA, C. (2001): PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.
- (13) TOMITA, S.; NICOLL, R. A. y BREDT, D. S. (2001): PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell Biol.* 153: F19-24.
- (14) NONG, Y.; HUANG, Y. Q.; JU, W.; KALIA, L. V.; AHMADIAN, G.; WANG, Y. T. y SALTER, M. W. (2003): Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422: 302-307.
- (15) ROCHE, K. W.; STANDLEY, S.; MCCALLUM, J.; DUNE LY, C.; EHLERS, M. D. y WENTHOLD, R. J. (2001): Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4: 794-802.

————— *Artículo original* —————

Antiapoptotic proteins Bcl2 and BclX do not protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-mediated growth arrest

Recibido el 31 de enero de 2006

M. TERESA GÓMEZ-CASARES¹, JOSÉ P. VAQUÉ², ANGELINA LEMES¹, TERESA MOLERO¹, NURIA FERRÁNDIZ²
Y JAVIER LEÓN^{2*}

¹*Servicio de Hematología, Hospital Dr. Negrín, Las Palmas, Spain*

²*Grupo de Biología Molecular del Cáncer, Departamento de Biología Molecular y Unidad de Biomedicina-CSIC, Universidad de Cantabria, Santander, Spain*

ABSTRACT

Imatinib (Glivec, Gleevec, STI571), a Bcr-Abl kinase inhibitor, is the most used drug in chronic myeloid leukemia. Imatinib induces apoptosis in a number of CML-derived cell lines, including K562. However, in order to achieve hematological remissions it is required chronic treatment with the drug, a fact inconsistent with a cytotoxic mechanism of imatinib in vivo. In this work we have analysed the effects of imatinib on the proliferation and apoptosis of K562-derived cell lines with constitutive expression of the anti-apoptotic genes Bcl2 and BclX. We found that imatinib-mediated apoptosis was completely abrogated in both Bcl2- and BclX-cell lines. However, imatinib inhibited proliferation, although growth rate was higher than in parental K562. We conclude that, besides its apoptotic effect, imatinib acts through an apoptosis-independent mechanism to arrest cell growth.

Key words: Bcl2.—BclX.—Imatinib.—K562.—CML.

* Corresponding author: Javier León, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain.

Phone: 34-942-201952; Fax: 34-942-201945; Email: leonj@unican.es

Abbreviations: CML, chronic myeloid leukemia.

RESUMEN

Las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y BclX no protegen a las células de leucemia mieloide crónica de la parada proliferativa inducida por imatinib

El imatinib (Glivec, Gleevec, STI571) es un inhibidor de la quinasa Bcr-Abl, y es el fármaco de más uso en leucemia mieloide crónica (LMC). El imatinib induce apoptosis en varias líneas celulares derivadas de LMC, entre ellas K562. Sin embargo, para obtener remisión hematológica es necesario el tratamiento continuado con imatinib, un hecho no consistente con un mecanismo de acción citotóxico *in vivo* del fármaco *in vivo*. En este trabajo hemos analizado los efectos del imatinib en la proliferación y apoptosis de líneas celulares derivadas de K562 con expresión constitutiva de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y BclX. Hemos encontrado que la apoptosis mediada por imatinib era completamente abolida en las líneas celulares con expresión de Bcl2 y BclX. Sin embargo, el imatinib inhibía la proliferación, aunque este efecto fue menos severo que en las células parentales K562. Concluimos que, además de su efecto apoptótico, el imatinib actúa a través de un mecanismo independiente de la apoptosis para detener la proliferación.

Palabras clave: Bcl2.—BclX.—Imatinib.—K562.—CML.

INTRODUCTION

Bcl2 and BclX (BclXL) are proteins of the BH2 super family. Both are mitochondria-located proteins with an apoptosis inhibitory activity. Most follicular lymphoma carry a chromosomal translocation involving Bcl2 locus that results in Bcl2 deregulation, and there are consistent reports of Bcl2 and BclX overexpression in many types of human cancer, through mechanisms different from chromosome translocation (1). Leukemia, including CML, is frequently associated to Bcl2 and BclX overexpression (2, 3). Impaired apoptosis is considered a crucial step in tumorigenesis. Indeed, a defective cell death program endows neoplastic cells with selective advantages, and with resistance to cytotoxic therapy.

Most of the patients of chronic myeloid leukemia (CML) are diagnosed in chronic phase, characterized by the clonal expansion of myeloid precursors, followed by a blastic crisis phase. The molecular hallmark of CML is the Bcr-Abl kinase, expressed in more than 95% of CML. This is a fusion protein with constitutive tyrosine kinase activity formed on the Philadelphia chromosome, that arises from a

reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 (4). Bcr-Abl is believed to be the major responsible for CML pathogenesis as it is able to transform hematopoietic cells and to induce myeloproliferative disease in mice after bone marrow repopulation with Bcr-Abl-expressing cells. The transformation pathways induced by Bcr-Abl are not fully understood, but it seems clear that apoptosis protection is a major mechanism by which Bcr-Abl allows the expansion of the leukemic clon (5, 6).

Although the outcome of CML in blast crisis is fatal, the disease can be cured by allogenic bone marrow transplantation during chronic phase. Interferon- α (IFN α) has been used in CML treatment, and in those patients where IFN α treatment failed, the treatment was based on hydroxyurea or busulfan (7). More recently, a new drug, imatinib (formerly STI571, trade name «Gleevec», or «Glivec»), was introduced in CML treatment. Imatinib is a potent inhibitor of the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl and it is rapidly displacing other treatments for CML (8). Imatinib is active *in vitro* on CML-derived cells, and it has been proposed that imatinib mechanism of action involves the apoptosis that follows Bcr-Abl inhibition (5, 6, 8).

In the present work we study the effect of Bcl2 and BclX overexpression on the response to imatinib of a CML-derived cell line. Our data indicate that both proteins inhibit the imatinib-mediated apoptosis but imatinib still impairs cell growth. Thus, imatinib acts through apoptosis-dependent and apoptosis-independent pathways. The results suggests that the action of imatinib as anti-CML drug *in vivo* may depend more on its cytostatic effects than on its apoptotic effects.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and drugs

K562 cell line was obtained from the American Type Culture Collection. Kbcl2v cells are K562 infected with a Bcl-2 retrovirus and expressing high levels of Bcl-2 protein. K562-BclX_L (KbclX) are cells transfected with Bcl-X_L (9). All cell lines were grown in RPMI 1640

medium (Invitrogen) containing 8% fetal calf serum and gentamycin (80 mg/mL). For proliferation assays, exponentially growing cells at a concentration of 250,000 cells per mL were treated with the indicated concentrations of hydroxyurea (Sigma), IFN α (kindly provided by Roche Farma, Madrid, Spain), busulfan (Sigma) and imatinib (kindly provided by Novartis, Basel, Switzerland).

Cell proliferation and apoptosis assays

Cells were counted in a hemocytometer. When appropriate, cell viability was scored with trypan blue vital staining. For thymidine incorporation assays, cells were incubated with 1 μ Ci/mL of 3 H-thymidine for 2 h, harvested onto glass wool filters and the radioactivity was counted by liquid scintillation. Each experiment was repeated at least three times. Cells with apoptotic morphology were analyzed by May-Grünwald-Giemsa staining of cytocentrifuge preparations, and scored by light microscopy. Binding of annexin V to cell surface was carried out by flow cytometry with annexin V-FITC following the manufacturer's instructions (Genzyme Diagnostics).

Northern analysis

RNAs were prepared by the guanidine thiocyanate method. RNAs (15 μ g of total RNA per lane) were separated by electrophoresis through agarose-formaldehyde gel and transferred to nitrocellulose. Probe labeling with [α - 32 P]dCTP and filter hybridization were carried out according to standard procedures. Probe for human *BCL2* was a 1.8 kb fragment from human cDNA.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to investigate a possible effect of Bcl2 and BclX on the antiproliferative activity of imatinib, we compared the growth rates of K562 (parental cells), Kbc12v and Kbc1X cells in response to imatinib at two concentrations of the drug (0.5 μ M and 2.5 μ M). The results are shown in Fig. 1A, and demonstrate that imatinib

significantly inhibited the growth of Kbc12v and Kbc1X cells, although to a lesser extent than K562.

It was conceivable that imatinib impaired the expression of the ectopic Bcl2 or BclX genes. To test this possibility we analysed the Bcl2 mRNA in Kbc12v cells treated with imatinib. The results (Fig. 1B) showed that imatinib did not affect Bcl2 expression at concentrations that were effective on the growth of Kbc12v cells. As previously described, parental K562 do not express Bcl-2 (9).

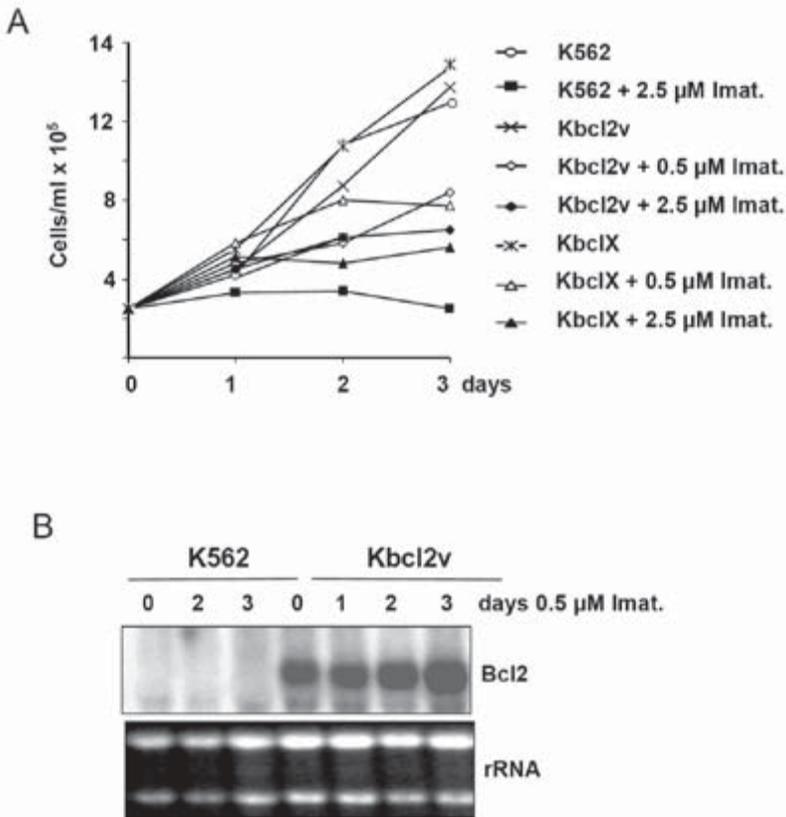


FIGURE 1. Effect of imatinib on K562 expressing Bcl-2 and Bcl-X_L. (A) Inhibition of proliferation determined by DNA synthesis in K562, Kbc12v and Kbc1X treated for the indicated period of times with 0.5 μM and 2.5 μM imatinib. (B) BCL2 expression in K562 and Kbc12v cells treated for 1, 2 or 3 days with 0.5 μM imatinib, as analyzed by Northern blot analysis. A picture of the filter after transfer showing the rRNAs stained with ethidium bromide is shown to assess the loading and integrity of the RNAs.

The retardation in growth rate of Kbc12v and Kbc1X provoked by imatinib could be explained by reduced cell proliferation or by increased apoptosis. To investigate this point we determined the DNA synthesis rate of DNA by the ^3H -thymidine incorporation method in the three cell lines treated with 0.5 μM and 2.5 μM imatinib for 48 and 72 h. The results indicate that DNA synthesis in parental K562 (as well as cells transfected with the empty vector, KXLSN, not shown) was almost completely suppressed after 72 h of treatment with 0.5 and 2.5 μM imatinib. Imatinib also decreased the DNA synthesis in Kbc12v and Kbc1X in a time- and dose-dependent manner (Fig. 2A). However, DNA synthesis rate in Kbc12v and Kbc1X was not suppressed but dramatically reduced (20% and 30% respectively with respect to controls). These differences in DNA synthesis were roughly consistent with the growth curves of the distinct cell lines (Fig. 1A).

Next we compared the effect of imatinib with the other three drugs used in CML treatment (hydroxyurea, busulfan and $\text{IFN}\alpha$). We chose drug concentrations slightly above the minimal cytostatic concentrations for the three cell lines: 2000 UI of $\text{IFN}\alpha$ per mL, 0.5 mM hydroxyurea and 0.5 mM busulfan (data not shown). K562, Kbc12v and Kbc1X cells were treated with the drugs at the indicated concentrations for 48 h and the ^3H -thymidine incorporation was measured. The results (Fig. 2B) indicate that neither Bcl-2 nor Bcl-X_L conferred resistance to the antiproliferative effect of busulfan, $\text{IFN}\alpha$ and hydroxyurea in K562, in accordance with the absence of cells showing apoptotic morphology (not shown).

Next we analysed whether Bcl2v and BclX were capable to antagonize the apoptosis elicited by imatinib in K562. We measured the apoptosis extent by determining the binding of annexin V to cell surfaces. This protein binds to phosphatidyl serine, which is exposed to the outer layer of plasma membrane during apoptosis. K562, Kbc12v and Kbc1X cells were treated with annexin V-FITC and binding determined by flow cytometry. The results (Fig. 3A) indicate that imatinib-mediated apoptosis was dramatically reduced in Kbc12v and Kbc1X. Similar result was observed by scoring cells with apoptotic morphology after Giemsa staining of the cells. Cytospin preparations of K562 cells treated with imatinib demonstrated a

high fraction of apoptotic cells which were absent in the Kbc12v and Kbc1X cells (Fig. 3B), thus confirming the result observed through the annexin V assay.

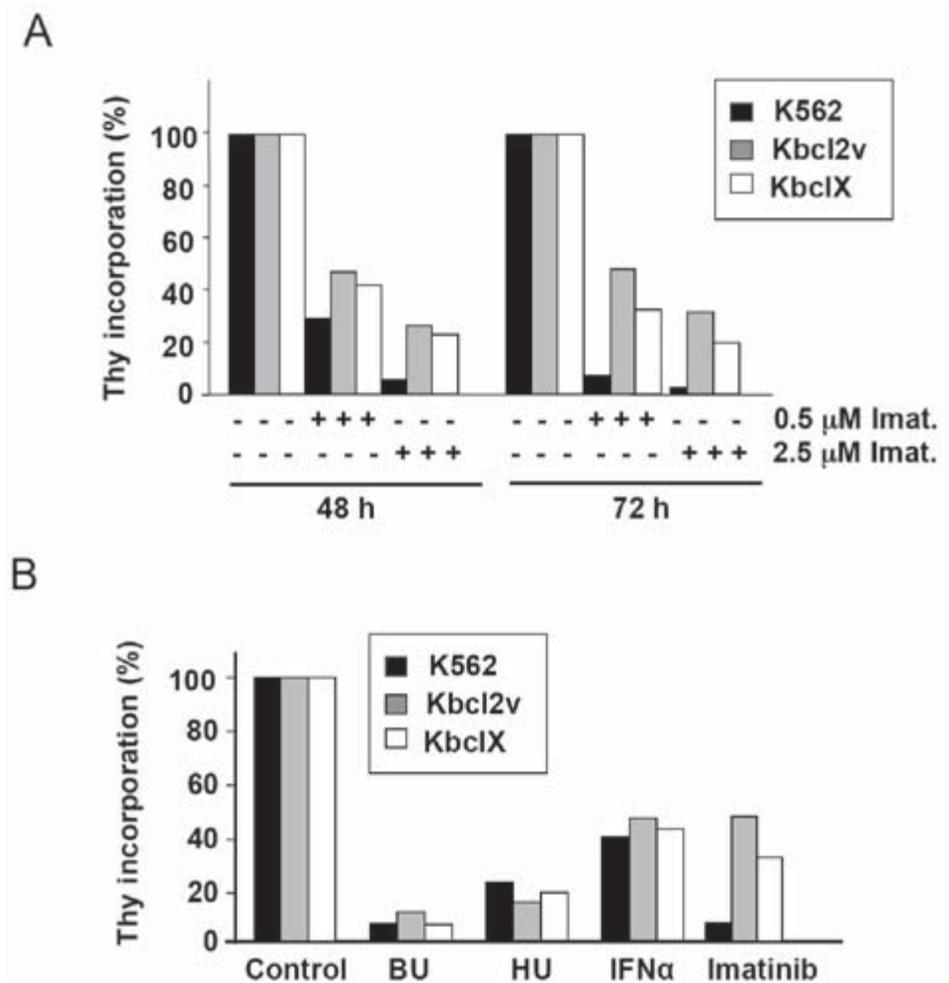


FIGURE 2. (A) Inhibition of DNA synthesis measured by ³H-thymidine incorporation in K562, Kbc12v and Kbc1X treated with 0.5 μM and 2.5 μM imatinib for 48 h and 72 h as indicated at the bottom of the graph. (B) Inhibition of DNA synthesis in K562, Kbc12v and Kbc1X treated with 0.5 mM busulfan (BU), 0.5 mM hydroxyurea (HU) and 2000 UI/ mL of IFNα for 72 h. The data obtained with 0.5 μM imatinib is included for comparison.

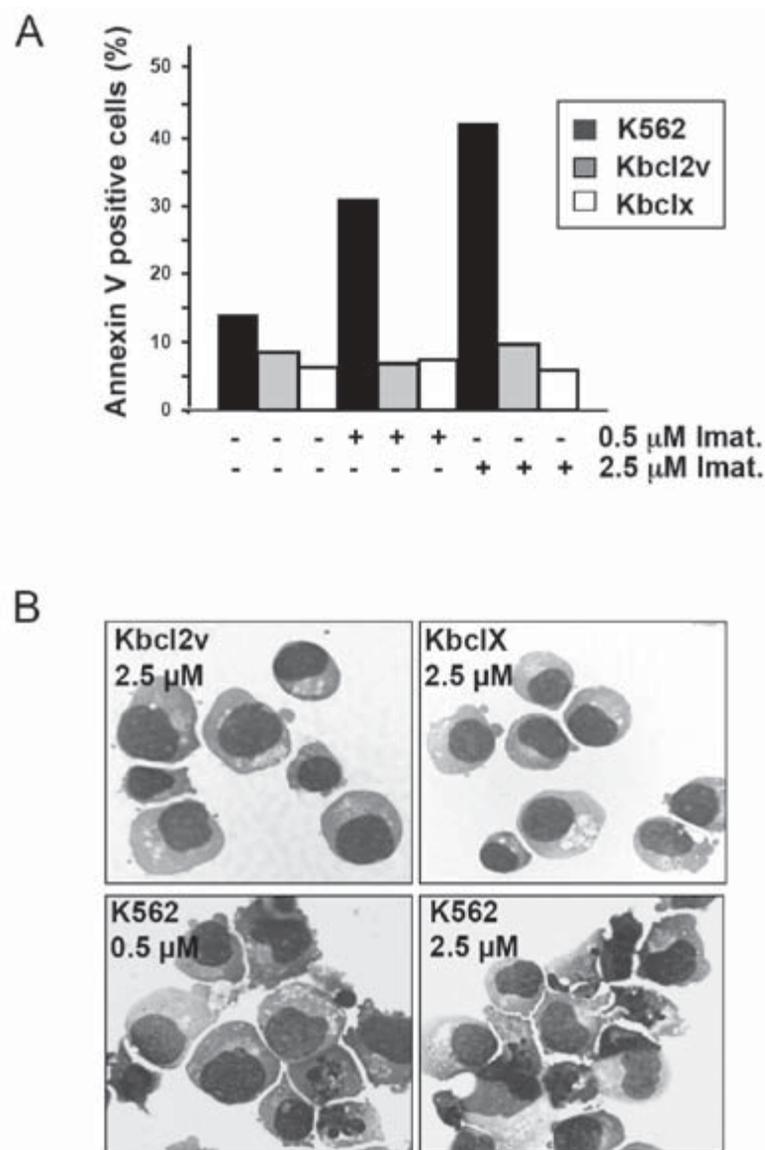


FIGURE 3. *Lack of apoptosis of Kbc12v and Kbc1X cells in the presence of imatinib. (A) Cells were treated for 2 days with 0.5 μM or 2.5 μM imatinib as indicated and the extent of apoptosis was assessed by the binding of annexin V to cell surface as determined by flow cytometry. (B) Cytospin preparations stained with May Grunwald-Giemsa of the indicated cells treated with 0.5 μM or 2.5 μM imatinib for 2 days. Note the absence of apoptotic cells in the Kbc12v and Kbc1X cell lines.*

These results confirm that Bcl2 and BclX conferred complete resistance to imatinib-mediated apoptosis. Although it has been proposed that apoptosis induction is a major mechanism for the cytotoxic effect of imatinib *in vitro* (5, 6) our results underscores the importance of apoptosis-independent mechanisms for imatinib antiproliferative activity. It is conceivably that non-apoptotic mechanisms are responsible for the cytostatic effect of imatinib, and allows the restoration of cell growth when the drug is removed. In consistency with this result, it has been reported that imatinib selectively suppresses CML primitive progenitors by reversing abnormally increased proliferation but does not significantly increase apoptosis (10).

Thus, our results suggest that the growth inhibitory effect of imatinib is mediated two concomitant mechanisms: one cytotoxic mechanism that triggers an apoptotic program and another cytostatic mechanism unrelated to apoptosis. This second mechanism would be the responsible for the growth retardation induced in cells expressing Bcl2 and BclX. Also, the results suggest that this cytostatic mechanism could be important for the imatinib activity *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pilar Frade, María Aramburu and Guillermo Santana for technical assistance, Novartis for imatinib, Roche España for interferon α and Jose Luis Fernández-Luna for Kbc1X cell line. The work was supported by grant PM98-0109 and SAF2002-04193 from Spanish Ministry of Science and Technology to J.L.

REFERENCES

- (1) KIRKIN, V.; JOOS, S. and ZORNIG, M. (2004): The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644: 229-49.
- (2) RAVANDI, F.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; FADERL, S.; GILES, F.J.; THOMAS, D.; CORTES, J.; ANDREEFF, M.; ESTROV, Z.; RIOS, M. B. and ALBITAR, M. (2001) Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. *Cancer* 91: 1964-72.

- (3) HANDA, H.; HEGDE, U. P.; KOTELNIKOV, V. M.; MUNDLE, S. D.; DONG, L. M.; BURKE, P.; ROSE, S.; GASKIN, F.; RAZA, A. and PREISLER, H. D. (1997): Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leuk. Res.* 21: 479-89.
- (4) DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M. and MELO, J. V. (2000): The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-56.
- (5) DAN, S.; NAITO, M. and TSURUO, T. (1998): Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR - ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ.* 5: 710-5.
- (6) FANG, G.; KIM, C. N.; PERKINS, C. L.; RAMADEVI, N.; WINTON, E.; WITTMANN, S. and BHALLA, K. N. (2000): CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 96: 2246-53.
- (7) SILVER, R. T.; WOOLF, S. H.; HEHLMANN, R.; APPELBAUM, F. R.; ANDERSON, J.; BENNETT, C.; GOLDMAN, J. M.; GUILHOT, F.; KANTARJIAN, H. M.; LICHTIN, A. E.; TALPAZ, M. and TURA, S. (1999): An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94: 1517-36.
- (8) DRUKER, B. J. (2002): STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 8: S14-8.
- (9) LERGA, A.; RICHARD, C.; DELGADO, M. D.; CANELLES, M.; FRADE, P.; CUADRADO, M. A. and LEON, J. (1999): Apoptosis and mitotic arrest are two independent effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in K562 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 256-64.
- (10) HOLTZ, M. S.; SLOVAK, M. L.; ZHANG, F.; SAWYERS, C. L.; FORMAN, S. J. and BHATIA, R. (2002): Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood* 99: 3792-800.

————— *Artículo original* —————

Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies

Recibido el 6 de febrero de 2006

YAHYA DAHMANY¹, ANA MARCUELLO¹, FRANCISCO JOSÉ MONTIEL-SOSA^{1, 2}, JULIO MONTOYA¹, CARMEN DÍEZ-SÁNCHEZ¹, MANUEL JOSÉ LÓPEZ-PÉREZ^{1, 3, *},
EDUARDO RUIZ-PESINI^{1, 3}

¹*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular.
Universidad de Zaragoza. Zaragoza.*

²*Present address: Departamento de Ciencias Biológicas.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.
Universidad Nacional Autónoma de México.*

³*These two authors have the same participation in the work.*

SUMMARY

The genetic variation in mtDNA has been widely used to give a maternal genetic perspective of the human demographic history. Here, we have studied this variability in 686 samples coming from the Centre and North of Spain. These results showed that haplogroup frequencies were similar to other Spanish studies and European populations. Haplogroups from the HV lineage were over-represented in the Spanish population. A deeper analysis of the mitochondrial haplogroup U showed differences with Northern Europe populations. The frequencies of haplogroups found give them high value when experimental design for mitochondrial disorder studies in population is planned. In addition, the use of these data is also important for forensic studies.

* Corresponding author: Dr. Manuel José López-Pérez. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. 50013 Zaragoza. Spain. Phone: 976-761642. Fax: 976-761612. Email: lopezper@unizar.es

Keywords: Mitochondrial DNA.—Human.—Variability.—Haplogroups.—Oxidative phosphorylation.

RESUMEN

Distribución de líneas mitocondriales en la población española: anticipándonos a los estudios de asociación

La variación genética en el mtDNA ha sido ampliamente utilizada para dar una perspectiva de la historia demográfica humana. En este estudio, nosotros hemos analizado esta variabilidad en 686 muestras del Centro y Norte de España. La frecuencia de los haplogrupos en la población española es muy similar a la observada en otros estudios sobre esta población y a las frecuencias en las poblaciones europeas. Un análisis más profundo del haplogrupo mitocondrial U mostró diferencias con las poblaciones del norte de Europa. El conocimiento de la distribución de frecuencias de los haplogrupos en nuestra población supone un resultado importante para el diseño de estudios sobre enfermedades mitocondriales. Además, nuestros resultados son también importantes en los estudios forenses.

Palabras clave: DNA mitocondrial.—Humanos.—Variabilidad.—Haplogrupos.—Fosforilación oxidativa.

INTRODUCTION

In 1997, different laboratories published an association between the mitochondrial genetic background and the Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) in patients with any of two different pathologic mutations, 11778A and 14484C (1-4). Mitochondrial haplogroup J was overrepresented in patients with any of these mutations and it was postulated that this haplogroup increased the penetrance of the pathologic mutation. Since then, other haplogroups have been associated with different phenotypes (5, 6), particularly with aging (7-10) and aging-related diseases, such as Parkinson disease (11-13) and Alzheimer disease (14, 15).

A mitochondrial haplogroup is a cluster of phylogenetically related mitochondrial genotypes (haplotypes). These haplogroups are defined by ancient mutations. These changes appeared and survived, therefore, they could not be deleterious mutations. Most of them probably had not phenotypic effect and they were neutral. Some of them had a beneficent effect and were positively selected. However,

this positive effect was related with a particular environment and nowadays, in other environmental conditions, they may have different effects on the phenotype (16-18).

Several major haplogroups (H, V, J, T, U, I, W, X) were described in Western Eurasian individuals (19) and their frequencies were very similar all around Europe (20). The increased interest in mitochondrial population genetics has made possible to subdivide these haplogroups in smaller clusters, called subhaplogroups. The frequency and distribution of these subhaplogroups is not the same in different European populations (6, 21-23). Similarly to the haplogroups, some of the mutations defining these subhaplogroups might have a phenotypic effect and then, they could contribute to the distinct prevalence of these diseases in different populations (24).

In advance of next epidemiologic studies in the Spanish population trying to associate phenotypes to mitochondrial genetic background, we decided to characterize the Spanish population according to the mitochondrial haplogroups.

MATERIAL AND METHODS

Peripheral blood was collected from 686 unrelated individuals from Northern and Centre of Spain (Zaragoza and Madrid).

Genomic DNA was extracted by conventional methods (25) and the samples were haplogrouped by PCR amplification of short mtDNA fragments, followed by restriction enzyme analysis (RFLP analysis). We used the haplogrouping strategy from (5) (Table 1). Hypervariable region I (HVR-I) was sequenced in order to confirm haplogroups and determine subhaplogroups U. Full description of oligodeoxynucleotides utilized and PCR amplification conditions are available upon request.

Results and differences in diverse mitochondrial variants among populations were assessed by the Chi square independence test from contingency tables and post hoc analysis. Significant differences were assumed when $P \leq 0.05$.

TABLE 1. *RFLP polymorphisms used for mtDNA Haplogroups determination. Individuals of non-European origin as haplogroups L (African), M (Asian) and those that we could not ascribe to any of the known Caucasian haplogroups were grouped as others (O) as it has been previously reported (5).*

** Indicate non synonymous polymorphism*

Haplogroups	Characteristic restriction site(s)	Hipervariable
	Coding-region mutations	Region I
H	- T14766C* <i>MseI, Tru9I</i>	
	- T7028C <i>AluI</i>	
V	- T14766C* <i>MseI, Tru9I</i>	T16298C
	- G4580A <i>NlaIII</i>	
HV*	- T14766C* <i>MseI, Tru9I</i>	
J	+ T4216C* <i>Afl III</i>	C16069T-T16126C
	- G13708A* <i>Mva I</i>	
T	+ T4216C* <i>Afl III</i>	T16126C-C16294T
	+ A4917G* <i>Mae I</i>	
U	+ A12308G <i>Hinf I</i>	
I		G16129C-C16223T
	- A4529T <i>Hae II</i>	G16391A
W	- G8994A <i>Hae III</i>	C16223T-C16292T
X		T16189C-C16223T
	+ T14470A <i>Acc I</i>	C16278T

RESULTS

The analysis of 686 Spaniard individuals from North and center of Spain gave us a picture of the haplogroup frequencies in the Spanish population (Table 2). Then, we compared our results with those from a collection of 718 Spaniard samples from the literature coming from the whole country (Table 2). The individual haplogroup frequencies were very similar, although we found significant differences ($\chi = 29.8$, $df = 9$, $P < 0.001$). These differences were due to an excess of HV* [P (post-hoc cell contribution-phcc) < 0.001] and a defect of W [P (phcc) = 0.009] individuals in our samples versus the other studies [HV*, [P (phcc) < 0.001]; W, [P (phcc) = 0.012]]. However, there was no difference in the major haplogroups. As we were interested in the haplogroup distribution in the whole country because epidemiologic studies require large populations and because the differences were only found in minor haplogroups, we decided to combine all the individuals in a big Spanish sample (1404 individuals).

Next, we compared the whole Spanish sample with a collection of 2648 European individuals from the literature (Table 2). We found significant differences in the haplogroup distribution ($\chi = 136.0$, $df = 9$, $P < 0.001$). H, V and HV* were overrepresented in the Spanish population but T, I, and O lineages were underrepresented [P (phcc) ≤ 0.009 , for all of them]. The opposite tendency was found in the European samples [P (phcc) ≤ 0.001 , for H, HV*, I and O].

Mitochondrial haplogroup U is an ancient cluster widely distributed in Western Eurasian and very well genetically defined. Therefore, we subdivided our 155 U samples in subhaplogroups and compared them to 1802 U European (6) and 455 Italian individuals (24) (Table 3). Despite some classification problems, we were able to confirm the previously observed tendency in the subhaplogroups U distribution. Those subhaplogroups defined by changes in very well evolutionary conserved positions in the cytochrome b were overrepresented in northern latitudes, the rest were prevalent in southern latitudes (Table 3). An exception was mitochondrial subhaplogroup K. Its prevalence was clearly higher in the South in both Spanish and Italian populations.

TABLE 2. *Mitochondrial haplogroups distribution (number of individuals and percentages values between bracket) in North and Centre of Spain. The results obtained in this study are compared with those found in other studies of Spain: Andalusia (158), Basque country (173), Catalonia (78), Centre Spain (50), Galicia (103), Valencia (30) [34] and Asturias (126) [35]; and European population [27]*

European Haplogroups	This study (N = 686)	Spain (N = 718)	Europe (N = 2648)
H	323 (47.1)	373 (51.9)	1134 (42.8)
V	34 (5.0)	45 (6.3)	111 (4.2)
HV*	31 (4.5)	8 (1.1)	—
J	61 (8.9)	53 (7.4)	260 (9.8)
T	47 (6.9)	40 (5.6)	211 (7.9)
U	155 (22.6)	137 (19.1)	579 (21.9)
I	4 (0.6)	4 (0.6)	59 (2.2)
W	4 (0.6)	14 (1.9)	54 (2.0)
X	8 (1.2)	13 (1.8)	40 (1.5)
O	19 (2.8)	31 (4.3)	200 (7.6)

DISCUSSION

Mitochondrial DNA only encodes proteins involved in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system and the tRNAs and rRNAs necessary to their expression. This system is the common final pathway in the cell energy production and it is ubiquitous. Therefore, it is a key component in the cell function. By affecting energy production, mitochondrial genetic variants might play a role in the resistance-susceptibility to different phenotypes. As previously mentioned, more and more diseases are being related to the mitochondrial genetic background. However, the molecular bases for these associations are far away to be completely understood yet. It is still unknown which are the haplogroup or subhaplogroup defining polymorphisms causing the phenotypic effects.

TABLE 3. *Subhaplogroups U distribution. Number of individuals and percentage values (in brackets) are given. NE and SE encode for North and South of Europe, respectively. 8 U5 samples from Spain were not subdivided. Urest from Italy includes U subhaplogroups belonging to U1811rest (24)*

Subhaplogroup U	Spain (N =155)	Italy (N = 455)	Europe	
			SE (N = 588)	NE (N =1214)
Urest	21 (13.6)	69 (15.2)	78 (13.3)	52 (4.8)
U4	9 (5.8)	41 (9.0)	59 (10.0)	235 (19.4)
U1811rest	18 (11.6)	72 (15.8)	63 (10.7)	130 (10.7)
Uk	48 (31.0)	154 (33.8)	156 (26.5)	280 (23.1)
U5a	21 (13.6)	72 (15.8)	79 (13.4)	309 (25.5)
U5b	30 (19.4)	47 (10.3)	153 (26.0)	208 (17.1)

A phylogenetic approach to the association studies has the benefit of being an external criterium. However, and due to the high mutational rate of the mtDNA, subhaplogroups from different haplogroups might have similar effects, therefore masking potential associations. In this sense, the lack of association in LHON patients with the haplogroup J in the Iranian population (26) has been recently solved by a finest haplogroup analysis (24). In this population, the major subhaplogroup J is different from that of the European population and it is not defined by those polymorphisms candidate to affect the OXPHOS functionality.

Haplogroups from the HV cluster (H, V and HV*) are more prevalent in the Spanish population. Haplogroup H originated in the Near East but its frequency in this region (20-30%) is lower than the European frequency (40-50%) (27). The Spanish frequency of this haplogroup is in the upper site of this range (49.6%). However, H subhaplogroups have highly distinctive geographical distributions (6, 21-23). The knowledge of these spatial patterns can have important implications for disease studies. Thus, Spanish families affected by nonsyndromic sensorineural deafness due to the mtDNA

1555G mutation in the 12S rRNA gene were overrepresented in the mitochondrial haplogroup H (28). Two alternatives could explain this fact. In the first one, the haplogroup might increase the penetrance of the mutation, similar to the LHON/haplogroup J phenomenon. In the second alternative, a founder event was proposed. The analysis of the H subhaplogroups allowed to chose the second one as the more probable explanation (21).

Haplogroup U has also been associated to different phenotypes (6, 29-31). Particularly interesting is its association with the MELAS syndrome. One study showed an excess of individuals from this haplogroup in patients with MELAS (30). However, another more extensive study was unable to reproduce this association (32). Interestingly, the first study was based in patients from northern Europe and the second one from the south and we have recently shown significant differences in the U subhaplogroup distribution in Europe (6). In the north, subhaplogroups U defined by polymorphisms in very well conserved positions of the cytochrome b and therefore with a potential phenotypic effect are overrepresented. It has been hypothesized that these genetic variants would affect the balance between the energy and heat production (6, 17, 18). Northern haplogroups would be biased to a higher heat production but lower energy production efficiency. The contrary situation would be found in Southern haplogroups. Being this true, then our results would suggest that the Spanish population, poorer in U subhaplogroups defined by cytb mutations, would be less susceptible to develop MELAS syndrome, as observed in one of the previous studies (32).

The finest characterization of the genetic background from different populations is a necessary first step to a rational approach in the epidemiologic association studies as previously proposed in the Human Genome Diversity Project (33).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank S. Morales for his technical assistance. This work was supported by the Aragon Government Consolidated Groups (B33), the Spanish Network for Mitochondria Disorders

(G03-011/G03-056), FIS (PI050639, PI050647 and PI050648) and the European Commission (QLG-CT-2001-0096).

BIBLIOGRAPHY

- (1) BROWN, M. D.; SUN, F. and WALLACE, D. C. (1997): Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 60, 381-7.
- (2) HOFMANN, S.; JAKSCH, M.; BEZOLD, R.; MERTENS, S.; AHOLT, S.; PAPROTTA, A. and GERBITZ, K. D. (1997): Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum Mol Genet* 6, 1835-46.
- (3) LAMMINEN, T.; HUOPONEN, K.; SISTONEN, P.; JUVONEN, V.; LAHERMO, P.; AULA, P.; NIKOSKELAINEN, E. and SAVONTAUS, M. L. (1997): mtDNA haplotype analysis in Finnish families with leber hereditary optic neuroretinopathy. *Eur J Hum Genet* 5, 271-9.
- (4) TORRONI, A. et al. (1997): Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60, 1107-21.
- (5) RUIZ-PESINI, E. et al. (2000): Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67, 682-96.
- (6) MONTIEL-SOSA, F.; RUIZ-PESINI, E.; ENRÍQUEZ, J. A.; MARCUELLO, A.; DÍEZ-SÁNCHEZ, C.; MONTOYA, J.; WALLACE, D. C. and LÓPEZ-PÉREZ, M. J. (2006): Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene* 368C, 21-7.
- (7) IVANOVA, R.; LEPAGE, V.; CHARRON, D. and SCHACHTER, F. (1998): Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology* 44, 349.
- (8) TANAKA, M.; GONG, J. S.; ZHANG, J.; YONEDA, M. and YAGI, K. (1998): Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* 351, 185-6.
- (9) DE BENEDICTIS, G. et al. (1999): Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J* 13, 1532-6.
- (10) NIEMI, A. K.; HERVONEN, A.; HURME, M.; KARHUNEN, P. J.; JYLHA, M. and MAJAMAA, K. (2003): Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112, 29-33.
- (11) VAN DER WALT, J. M. et al. (2003): Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 72, 804-11.
- (12) GHEZZI, D. et al. (2005): Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet* 13, 748-52.
- (13) PYLE, A. et al. (2005): Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol* 57, 564-7.
- (14) CHAGNON, P.; GEE, M.; FILION, M.; ROBITAILLE, Y.; BELOUCHI, M. and GAUVREAU, D. (1999): Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates

- significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet* 85, 20-30.
- (15) VAN DER WALT, J. M. et al. (2005): Maternal lineages and Alzheimer disease risk in the Old Order Amish. *Hum Genet* 118, 115-22.
 - (16) MISHMAR, D. et al. (2003): Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 171-6.
 - (17) WALLACE, D. C.; RUIZ-PESINI, E. and MISHMAR, D. (2003): mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68, 479-86.
 - (18) RUIZ-PESINI, E.; MISHMAR, D.; BRANDON, M.; PROCACCIO, V. and WALLACE, D. C. (2004): Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303, 223-6.
 - (19) WALLACE, D. C.; BROWN, M. D. and LOTT, M. T. (1999): Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211-30.
 - (20) TORRONI, A. et al. (1996): Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835-50.
 - (21) ACHILLI, A. et al. (2004): The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75, 910-8.
 - (22) LOOGVALI, E. L. et al. (2004): Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol Biol Evol* 21, 2012-21.
 - (23) PEREIRA, L. et al. (2005): High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res* 15, 19-24.
 - (24) CARELLI, V. et al. (2006): Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: Novel clues from the analysis of leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Am J Hum Genet* 78, 564-74.
 - (25) DÍEZ-SÁNCHEZ, C.; RUIZ-PESINI, E.; LAPENA, A. C.; MONTÓYA, J.; PÉREZ-MARTOS, A.; ENRÍQUEZ, J. A. and LÓPEZ-PÉREZ, M. J. (2003): Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod* 68, 180-5.
 - (26) HOUSHMAND, M.; SHARIFPANAHI, F.; TABASI, A.; SANATI, M. H.; VAKILIAN, M.; LAVASANI, S. H. and JOUGHEHDUST, S. (2004): Leber's hereditary optic neuropathy: the spectrum of mitochondrial DNA mutations in Iranian patients. *Ann N Y Acad Sci* 1011, 345-9.
 - (27) RICHARDS, M. et al. (2000): Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67, 1251-76.
 - (28) TORRONI, A. et al. (1999): The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am J Hum Genet* 65, 1349-58.
 - (29) MAJAMAA, K.; FINNILA, S.; TURKKA, J. and HASSINEN, I. E. (1998): Mitochondrial DNA haplogroup U as a risk factor for occipital stroke in migraine. *Lancet* 352, 455-6.
 - (30) PULKES, T.; SWEENEY, M. G. and HANNA, M. G. (2000): Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet* 356, 2068-9.
 - (31) CRIMI, M.; DEL BO, R.; GALBIATI, S.; SCIACCO, M.; BORDONI, A.; BRESOLIN, N. and COMI, G. P. (2003): Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical

- features in patients with single mtDNA macrodeletion. *Eur J Hum Genet* 11, 896-8.
- (32) TORRONI, A. et al. (2003): Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation. *Am J Hum Genet* 72, 1005-12.
- (33) CAVALLI-SFORZA, L. L.; WILSON, A. C.; CANTOR, C. R.; COOK-DEEGAN, R. M. and KING, M. C. (1991): Call for a worldwide survey of human genetic diversity: a vanishing opportunity for the Human Genome Project. *Genomics* 11, 490-1.
- (34) PLAZA, S.; CALAFELL, F.; HELAL, A.; BOUZERNA, N.; LEFRANC, G.; BERTRANPETIT, J. and COMAS, D. (2003): Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean. *Ann Hum Genet* 67, 312-28.
- (35) HUERTA, C. et al. (2005): Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J Neurol Sci* 236, 49-54.

————— *Necrológica* —————

**Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo.
Señor Don Antonio Portolés Alonso**



El Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso nació el día 31 de diciembre de 1923 en Madrid. Tomó posesión como Académico de Número el día 16 de octubre de 1986 de la Medalla número 8. Falleció el día 12 de julio de 2005. La Sesión Necrológica se celebró el día 1 de diciembre de 2005, participando el Excmo. Señor Don David Martín Hernández, el Ilmo. Profesor Doctor Don Rubén López García y la Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé. Fue presidida por el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Reflexiones sobre las fuentes vitales de las actuaciones del excepcional Académico

DAVID MARTÍN HERNÁNDEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,

Excmas. Señoras Académicas,

Excmos. Señores Académicos,

Querida Familia Portolés-Pérez Ureña,

Señoras y Señores,

Se me ha encomendado la gratificante tarea de ser uno de los cuatro ponentes que intervendrá en la presente sesión necrológica en memoria del Excmo. Señor Académico de Número, Presidente de la Sección 6.^a de Historia, Legislación y Bioética, Don Antonio Portolés Alonso.

Reconozco la emoción y el honor que para mí supone hablar aquí en este acto del Doctor Portolés, aunque al mismo tiempo, no deje de darme cuenta de la responsabilidad que con ello asumo.

Me unía una sincera amistad con el Doctor Portolés, y me sigue uniendo un gran afecto a su familia, y he aceptado con entusiasmo este honor. De lo que no estoy tan seguro es de alcanzar la calidad necesaria para reflejar lo que desearía, con el fin de resaltar la excepcional personalidad humana de quien quisiera esbozar sus rasgos más sobresalientes.

Con la ayuda de Dios y la indulgencia de todos ustedes, inicio mi humilde glosario.

En primer lugar, mi sincero agradecimiento a todos los que me han aportado datos, y en especial a su amable familia.

Destacaría principalmente la calidad humana de Don Antonio. Desde el primer contacto se advertía su gran bondad, que fluía de sus principios auténticamente religiosos, afabilidad, templanza, inquietud investigadora y gran tesón.

Nació el día 31 de diciembre de 1923 en Madrid, y fue el mejor regalo que recibió el matrimonio madrileño de raíces aragonesas (abuelos de Calandra, Teruel). Le cuidaron con el amor de único hijo, a quien infundieron los buenos principios que le acompañarían toda su vida, junto con el recuerdo y la extraordinaria admiración hacia su progenitor.

Las peligrosas circunstancias de la capital de España en la situación de la Guerra Civil, obligaron a que, con gran dolor, trasladaran a su hijo de doce años, en la pre-adolescencia, a la ciudad de Olmedo (Valladolid). Posteriormente, se trasladaría a Burgos, acogido generosamente por la familia de su amigo el Doctor Don Emilio Ronda Loin.

Así permaneció durante largo tiempo en condiciones adversas, separado de sus padres y amigos. Pasada la Guerra Civil se produjo el feliz reencuentro con sus padres.

Sus especiales cualidades físicas y psíquicas, y el recuerdo de las enseñanzas paternas, hicieron que esas durísimas circunstancias forjaran su espíritu emprendedor y resistente, lejos de convertirlo en un chico resentido o traumatizado por las adversidades que tuvo que afrontar, y mantuvo lazos de agradecimiento con estas familias.

Su gran atracción por las Ciencias de la Salud y Experimentales le dirigió a iniciar su carrera de Farmacia y posteriormente la de Ciencias Biológicas, que culminaron en ambas disciplinas con brillantes títulos de doctor.

Perteneció, por tanto, a esa generación que, merced a la inteligencia y al esfuerzo, contribuyeron, en circunstancias muy adversas, a sentar las bases del desarrollo científico actual.

Su anhelo por volar, surgida probablemente en Olmedo, donde tuvo ocasión de relacionarse con los aviadores italianos que allí estaban instalados, le inclinaron hacia la carrera militar en la Academia del Ejército del Aire donde desarrolló su labor como farmacéutico analista, compaginándolo con la investigación microbiológi-

ca. Recibió los reconocimientos del ejército de la Cruz y la Placa de San Hemenegildo.

Esta vocación investigadora le supusieron mucho sacrificio personal y familiar, pero también muchas satisfacciones.

El Profesor Doctor Don Rubén López García tendrá ocasión de desarrollar, a continuación, esta faceta de gran investigador desde la visión del que fuera su entrañable colaborador.

Reflejo de su espíritu disciplinado y de su gran fuerza de voluntad eran los carteles elocuentes que adornaban su despacho con frases como:

«Hay que buscar la verdad dondequiera que esté, y aceptarla sin mirar de dónde viene», o un panel en el que un ratoncito se esforzaba por arrastrar cuesta arriba a un elefante mientras decía: «Where there's a will there's a way» (Allí donde haya un deseo, se encontrará una solución).

Su capacidad y vocación emprendedora le llevaron también a dedicarse con afán y especial cariño a las labores organizativas de esta Academia, donde, bajo la dirección del Profesor Don Rafael Cadórniga, ocupó durante varios años el cargo de Secretario, como tendrá oportunidad de desarrollar la Profesora Doctora M.^a del Carmen Francés Causapé.

En la faceta personal de Don Antonio resalta su resistencia física y su afán de superación, llegando a ser un buen deportista y destacando en gimnasia, equitación y esquí, donde consiguió varios trofeos en competiciones y socorrismo de montaña.

Asimismo, mostró tener muchas cualidades para las artes, como la pintura y la escritura, artes que tuvo ocasión de desarrollar desde una edad muy temprana y luego estando becado en París, donde dedicaba los ratos libres que su trabajo de investigación en el Instituto Pasteur le permitían para desarrollar dichas aficiones.

Estaba de nuevo alejado temporalmente de su familia (en aquel entonces ya con tres hijos muy pequeños) pero la observación de los pintores espontáneos en la Place du Tertre en Montmartre le permitió observar, aprender, entretenerse y desarrollar una faceta para la que siempre tuvo grandes cualidades.

En dicho sentido, tuvo ocasión de fomentar dicha vocación artística especialmente durante sus últimos años de vida, habiendo donado dos importantes esmaltes al Museo de la Real Academia Nacional de Farmacia.

También, en estos últimos años, dedicó parte de su tiempo a escribir, tanto en prosa como en verso, ofreciendo con gran simpatía versos a los miembros de su familia y a los aconteceres políticos y sociales del momento.

Además de sus innumerables méritos científicos y académicos, el Doctor Portolés siempre consideró que su gran obra fue su familia: familia que construyó en compañía de su inseparable esposa Doña M.^a Teresa. Juntos formaron una pareja muy bien compenetrada que ha transmitido a sus hijos y nietos, con gran cariño, principios y valores humanos. Como Doctora en farmacia, Doña M.^a Teresa colaboró con él en muchos de sus importantes trabajos y publicaciones.

Para terminar, quisiera recordar aquella sentencia de Confucio que creo que resume ejemplarmente la vida del Doctor Don Antonio Portolés:

¿Hay un precepto que puede guiar la acción de toda una vida?:
AMOR.

En memoria de Antonio Portolés: la amistad y la inteligencia al servicio de la Microbiología

RUBÉN LÓPEZ GARCÍA
Profesor de Investigación del CSIC

Excmo. Señor Presidente,

Excmos. e Ilmos. Señores Académicos,

Señoras y Señores,

Queridos amigos,

Al hablar hoy en esta docta Academia debo confesar, en primer lugar, un sentimiento ambivalente. Por una parte, de agradecimiento hacia esta Real Institución por haberme concedido el honor de ocupar esta tribuna para glosar la irrepetible personalidad de mi maestro Antonio Portolés. Mi segunda impresión es de dolor, un dolor muy sentido, porque siempre pensé, con ingenuidad imperdonable, que en mis vivencias futuras nunca me faltaría la presencia de mi mentor para recibir uno de sus impagables consejos. Esos consejos que en mis largos años de convivencia en su laboratorio fueron forjando mi madurez como científico y como ser humano.

Desgraciadamente, mi maestro y amigo, el Profesor de Investigación Antonio Portolés Alonso falleció en Madrid el pasado 12 de julio. Antonio ha personificado un referente y un ejemplo de profesionalidad para decenas de microbiólogos españoles pero, sobre todo, ha sido, para aquellos que hemos tenido la suerte de trabajar con él, un hombre singular. Farmacéutico de profesión pero, sobre todo, biólogo de vocación, Antonio supo crear en el marco que nos proporcionaban los escuálidos laboratorios del histórico edificio del Centro de Investigaciones Biológicas de la calle de Velázquez, una atmósfera de continua y apasionada entrega en el estudio de la microbiología. Esa pasión contagiosa la llevaremos muchos de sus discípulos

hasta el final de nuestras vidas. El Profesor Portolés aprendió a simultanear, por auténtica necesidad vital, su trabajo como microbiólogo con su carrera militar en el Cuerpo de Farmacia del Ejército del Aire, donde obtuvo el número 1 de su promoción. También en esa profesión, donde alcanzó el grado de Comandante, fue un triunfador nato. Aún resuenan en mis oídos las anécdotas sobre sus vuelos a diferentes puntos de la geografía española a bordo de aquellos aviones que confiaban el éxito de sus singladuras, más en la confianza de sus amigos y expertos pilotos que en las condiciones técnicas que cabría esperar del aparato. Pero la vida había forjado en Antonio el hábito de enfrentarse a situaciones difíciles con una casi permanente sonrisa que, a todos, nos infundía confianza.

En muchas ocasiones he pensado que esa confianza en lo que hacía tenía profundas raíces en la dura juventud que le tocó vivir en medio de una guerra fratricida afrontando situaciones de penuria que a un adolescente de nuestros días le parecería una experiencia difícil de imaginar. Siempre recordaré que Antonio resaltaba con un apasionamiento, impropio de los años que recordaba, el espíritu de autodisciplina impuesto para sobrellevar aquel áspero día a día de nuestra guerra, y, lo que resultaba aún más admirable, obligado a frecuentar en esos turbulentos años aquellos Institutos de Enseñanza Media, que bien podríamos llamar de campaña, supo beneficiarse de ellos con inteligencia y aprovechamiento.

Antonio, una vez terminada con brillantez su licenciatura en Farmacia, comenzó a simultanear su carrera militar con su trabajo en el laboratorio del Profesor Don César González Gómez en la Facultad de Farmacia. Allí se doctoraría y pronto comenzaría a publicar los resultados de su trabajo. En el año 1950 se incorporaría como becario al CSIC y dos años más tarde al Centro de Investigaciones Biológicas donde trabajaría hasta su jubilación como Profesor de Investigación. Antes de que esto sucediera, el Profesor Portolés crearía el Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, y conduciría con buen pulso profesional y afectivo, durante unos años, la dirección del CIB. No obstante, siempre percibió con claridad que precisaba incorporar nuevos conocimientos a su imparable vocación microbiológica para convertirse en un científico de referencia, lo que le llevó a marchar a Sheffield (Inglaterra) aunque ese esfuerzo impli-

cara el alejamiento momentáneo de la familia que ya había comenzado a formar con su mujer, nuestra M.^a Teresa.

De su estancia en Inglaterra se trajo en la mochila de antiguo esquiador y montañero (deportes que practicó con éxito y entusiasmo), un artilugio en piezas pequeñas que, una vez ensambladas, habrían de convertirse, para tortura de algunos de nosotros, en el primer quimiostato que funcionaría en España. Con el nunca bien ponderado Cultivo Continuo sufrimos y disfrutamos pero, particularmente, nos curtimos en los sinsabores y en las alegrías de trabajar con microorganismos. Con estos mimbres afrontó Antonio el desafío que significaba entonces trabajar en ciencia en España y publicar los resultados en el extranjero. Por aquel tiempo, los logros científicos de Antonio comenzaban a brillar con luz propia y por ello atrajo a su laboratorio a muchos jóvenes que, como es mi caso, percibíamos que se trataba de un profesional preparado y, algo muy importante, de una persona generosa para compartir con sus discípulos sus muchos conocimientos. Además del que os habla, acudirían a su grupo jóvenes investigadores que hoy son grandes científicos, como atestiguan los ejemplos de los Profesores de Investigación Ernesto García y Manolo Espinosa. Luego se unirían al grupo el Profesor Victoriano Campos, hoy Catedrático de la Universidad de Valparaíso (Chile) y el Doctor J. M. Rojo, ambos Académicos de esta Institución, las Doctoras Isabel Barasoain y Concha Ronda, el Doctor Nazario Rubio, hoy investigador del Instituto de Neurología Ramón y Cajal del CSIC, y un larguísimo etcétera de doctores formados en su laboratorio como ejemplarizan grandes profesionales como Purificación Fernández, Ramón Corripio, Tere Iriarte, Paco Ramos, M.^a Ronda, y así, para no hacer tedioso mi parlamento, hasta un total de más de cuarenta doctores formados en su laboratorio, siempre estrecho en dimensiones, pero inconmensurable en afectos.

Estos afectos no eran simple retórica, ya que se materializaban en hechos que sólo la necedad podría considerar menores. Así, cuando después de arduos esfuerzos podíamos, finalmente, acariciar ese ejemplar de la Memoria de Tesis, que encerraba el germen de nuestra futura carrera científica, aprendíamos, asimismo, que nuestro trabajo había sido posible gracias al esfuerzo de compañeras casi anónimas a la hora de los halagos. Por eso, contraíamos desde entonces una permanente deuda de gratitud hacia dos queridas ami-

gas: Maite Alda y Marisa del Pozo, quienes unían a su aptitud profesional un gran afecto hacia Antonio y hacia todos nosotros. Antonio nunca me perdonaría si no dejara constancia, en un día como hoy y en este marco singular, de su agradecimiento hacia estas dos queridas compañeras.

Soy consciente de que esta imagen profesional que acabo de delinear sobre el devenir y las orientaciones de nuestro laboratorio pueden sonar obsoletas en los tiempos que corren, donde se conjugan con dificultad, en demasiadas ocasiones, productividad científica y amistad. Pero, en contrapartida, mi relato aspira a colocar en su justo lugar las coordenadas que en los años sesenta y setenta del pasado siglo tenían que marcarse aquellos maestros, que ejemplariza el caso de Antonio como ningún otro, para llegar a convertirse en los auténticos pioneros e impulsores de la moderna Microbiología de la que hoy disfrutamos. Y, así, animó nuestros temores, en los años sesenta del pasado siglo, para que comprendiéramos y afrontáramos el reto que suponía encaminar nuestros pasos hacia laboratorios de excelencia fuera de nuestro país. Siempre nos preparó profesionalmente para que, más pronto que tarde, adquiriéramos, a través del conocimiento, la fortaleza imprescindible para seguir su envidiable estela a la hora de formar nuevos microbiólogos y, ¡ahí es nada!, para que creásemos grupos competitivos de investigación. Ésa, Antonio, fue tu cátedra personal enraizada en el afán de conjugar sabiduría y afecto, y desde la cual tus discípulos hemos procurado ampliar las enseñanzas que de tí recibimos. Confiamos en no haberte defraudado demasiado a la hora de cumplir tus expectativas.

Antonio publicó, si la memoria no me falla, más de dos centenares de trabajos científicos. Entre las líneas de investigación que exploró estaban la fisiología microbiana, una gran olvidada en la Microbiología de hoy, que algunos hemos tratado de recuperar para que la biología molecular no nos impida olvidar con su pujanza que trabajamos con seres vivos. Luego, vendrían los trabajos, en ocasiones pioneros, sobre la incorporación de la ingeniería genética a los microorganismos, y el reconocimiento internacional en este campo se plasmó en la brillante organización que realizó como Presidente del IV Congreso Internacional de Transformación y Transfección Genética celebrado, excepcionalmente, en las salas del Palacio de Carlos V en 1976 en la ciudad de Granada. Durante el acto de clau-

sura el Profesor Thomas Trautner, vicepresidente del Instituto Max Planck y un gran amigo nuestro, sinceramente impresionado por el éxito científico y por el marco mágico que envolvió al congreso, se atrevió a bromear sobre esa cualidad *cuasi* taumatúrgica que poseía Antonio para desarrollar con brillantez sus compromisos, al afirmar que no le resultaría extraño que, en pleno verano granadino, «mañana Antonio nos obsequiara haciendo aparecer la nieve sobre Sierra Nevada».

Pero nuestro siempre inquieto maestro no conocía fronteras en su frenética actividad y se atrevió, una vez más con éxito, a crear una escuela de Inmunólogos, con especial dedicación a la investigación inmunofarmacológica, que continúa en la actualidad bajo el liderazgo de José M.^a Rojo, Isabel Barasoain y de su hija Pilar Portolés. Si me permite por un momento una incursión a la frivolidad, en un acto con la solemnidad exigida al foro que hoy nos ocupa, creo que él, mejor que nadie, podía definir su turbulenta entrega al trabajo cuando, aflorando su innegable gracia madrileña, en sus momentos de agobio solía decirme: «Rubén, hoy me siento como un gato en una fábrica de sifones». No obstante, Antonio, no traeré aquí como bandera de agitación demagógica los índices de impactos ni otras estimables medidas bibliométricas que se establecen para valorar la producción científica, y que, ahora con demasiada frecuencia, se usan de forma torticera como moneda de cambio. Ese uso espurio condiciona en demasía estos días las relaciones entre los científicos, y, aplicado a nuestro pasado no tan lejano, olvida, muy a menudo, el difícil contexto donde tenías y teníamos que desarrollar nuestro trabajo. Tus aportaciones científicas fueron de una suerte superior a todos los impactos concebibles porque proporcionaron una sin par plataforma para formar a decenas de científicos de calidad, pero, sobre todo, para procurarnos un rico horizonte donde saber valorar el factor humano.

Son tantas las iniciativas que debemos a Antonio en el campo de la Microbiología que estoy seguro de no poderlas abarcar como él se merece. Su cariño hacia la Sociedad Española de Microbiología no tenía límites: fue un *Secretario* inolvidable y desde esa atalaya impulsó las publicaciones de esa Sociedad, la celebración de reuniones periódicas y el crecimiento de la familia, ¡larga familia!, que hoy formamos los microbiólogos españoles. La Microbiología ha sufrido

en los últimos cincuenta años muchos avatares. Se pensó que esas «balas mágicas» que han representado los antibióticos habían puesto un punto final a las bacterias patógenas. Ya sé, Antonio, que muchas veces hemos coincidido a la hora de concluir nuestras charlas que los que sostenían esa insensatez, simplemente, no eran biólogos. Habían olvidado que las bacterias están entre nosotros desde hace más de 3.500 millones de años y, para bien y para mal hoy, más que nunca, «gozan de buena salud» y son una impagable fuente de enseñanzas y, en el futuro inmediato, serán una insólita veta de innovación.

Eras un maestro convencido de que teníamos que volver a colocar la doctrina que estudia a los seres microscópicos en el lugar que le corresponde: porque, ahora, como casi siempre, los microbios siguen siendo la primera causa de muerte en este desigual mundo. De ahí que, nunca satisfecho a la hora de crecer en sabiduría y en entrega a los demás, desarrollaras desde tu puesto de Secretario de la Real Academia de Farmacia, ya jubilado del CSIC, una fructífera labor, porque siempre he pensado que ese impulso imparable que tenías para realizar ciencia te venía de compartir con nuestro Calderón de la Barca la idea de que: «A la vista de las Ciencias, la ignorancia es no saber aprovecharlas». Es decir, creías firmemente que lo contrario de la ciencia es la complacencia. Así, te entregarías, sin límites en tu lucha intelectual, a que se potenciara el Anuario que sanciona esta Real Academia (siempre nos acuciabas para que presentáramos colaboraciones a esa revista), y, asimismo, para que surgiera una atmósfera renovadora de la microbiología en esta docta institución, con la inclusión entre sus académicos de nuevos y acreditados practicantes de la microbiología como nuestra compañera del CIB la Doctora Concha García Mendoza, que se unía así a otros veteranos e ilustres miembros, como es el caso de otro de mis maestros el Profesor J. R. Villanueva, y el de los Profesores M. Rubio y Román de Vicente.

Pero, alentando todo cuanto he dicho, emerge la figura de la Doctora M.^a Teresa Pérez Ureña, tu fiel y entregada compañera. Con ella creó Antonio una envidiable simbiosis para llevar a buen puerto las múltiples facetas familiares y profesionales en las que se empeñó con pasión. Para nosotros, sus discípulos, Mari Tere ha sido una consejera singular a la que nunca le faltó una palabra de aliento en

los difíciles momentos que, en tantas ocasiones, hemos pasado sus becarios frente a esa poyata que en el laboratorio, a menudo, «traicionaba» con su implacable rigor científico nuestras hipótesis experimentales. Bien sabes Mari Tere que, sin fisuras, siempre contarás con nuestro reconocimiento y ahora, más que nunca, nos gustaría devolverte un poco del aliento y del afecto que tú nos has proporcionado en tantas oportunidades difíciles de nuestra vidas.

Descansa en paz, querido e irrepitible maestro, pero, antes de terminar, déjame usurparte, a ti que con tanto esmero cuidabas el estilo literario de tus escritos, uno de los *latines* que de ti aprendimos y que, en esta oportunidad, tan adecuadamente define y resume tu fructífera vida: *Sic luceat lux*.

Muchas gracias por su atención.

Antonio Portolés Alonso: Académico

MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Me cabe el triste encargo de la Junta de Gobierno de esta Real Academia Nacional de Farmacia, y a propuesta de la Sección Sexta, intervenir en esta Sesión Necrológica en Memoria del Doctor Don Antonio Portolés Alonso para glosar su figura como Académico.

Fueron casi dos años los que ocupé el cargo de Vicesecretaria colaborando con Don Antonio, como Secretario de esta Corporación, quien al dejar el cargo me dirigió una carta personal el 13 de octubre de 1997 en la que, por tener que ocuparme con carácter interino de la Secretaría, con su habitual deferencia, elegancia y caballerosidad, me decía: «siento haberte complicado algo la vida en la Academia». No podíamos intuir ninguno de los dos la circunstancia insólita en que en mi nueva situación de «Académica de Número de base», producida tan sólo hace unos minutos, me cupiera llevar a cabo la tarea que ahora abordo con motivo del luctuoso hecho de su desaparición.

Don Antonio era hombre educadísimo, de una rectitud tal en su ánimo y en su mente que su vida era un completo equilibrio. Reinaba la armonía en su persona, en su vida familiar, profesional, social y académica en particular, por lo que se ganó en vida nuestra estima, respeto, confianza, admiración, amistad y afecto. Le hemos perdido y, como decía Domingo Henares:

*«...morir es cosa de un segundo,
que es del tiempo la parte más pequeña,
llavera de las puertas de otro mundo».*

Don Antonio Portolés Alonso nació en Madrid en 31 de diciembre de 1923 y murió en la misma localidad el 12 de julio de 2005 a los ochenta y un años de edad. Su protagonismo en esta Real Academia,

que estuvo exento de todo personalismo, se caracterizó por una modélica convivencia y una enorme creatividad que sirvió de crucial inspiración para otros Señores Académicos. No podría ser menos en una figura como la de él, que siempre se significó por su «excelencia» científica y su «excelencia» en lo personal.

I. ANTONIO PORTOLÉS: ACADÉMICO CORRESPONDIENTE

En esta Real Academia siempre se consideró a Don Antonio como una personalidad científica destacada, prueba de ello es que en el año 1952 se le concedió el Premio «Clariana» y en 1964 el Premio de la «Real Academia de Farmacia» en el Concurso Científico del año 1963. No es extraño por ello que el 26 de abril de 1965 avalaran su candidatura como Académico Correspondiente, los Académicos de Número Doctores Don Lorenzo Vilas, Don Ángel Santos y Don Arturo Eyries. En esta ocasión el trabajo que envió, junto a su magnífico *currículum vitae*, versaba sobre *Problemas inmunológicos en relación con la Antibioterapia* que, en ese momento, según el informe emitido por el Doctor Don Lorenzo Vilas, el 3 de junio de 1965, era un «tema de gran actualidad... apoyado en abundante y moderna literatura, además de su propia opinión, basado en sus trabajos experimentales», y termina el Doctor Vilas asegurando que «es un trabajo digno, moderno e interesante». En conclusión, en la Junta de Gobierno de 16 de diciembre de 1965 fue admitido en la Corporación como Académico Correspondiente, lo que le comunicó el entonces Secretario Perpetuo, Don Toribio Zúñiga y Sánchez-Cerrudo, el 20 de diciembre de ese año y con esta categoría estaría vinculado a la Real Academia hasta el año 1986. Su trabajo científico fue publicado en el número tres de los Anales del año 1966 y su participación activa en las tareas científicas de la Real Academia se hizo patente en las publicaciones que llevó a cabo en la revista de la Corporación hasta su incorporación como Académico de Número.

II. ANTONIO PORTOLÉS: ACADÉMICO DE NÚMERO

Por Resolución de 22 de septiembre de 1983, firmada por el entonces Secretario Perpetuo, Don Manuel Ortega Mata, se publica-

ba en el *Boletín Oficial del Estado* de 27 de octubre de ese año, la convocatoria para cubrir la vacante producida en la Medalla Número 8 por el fallecimiento del Doctor Don Juan Abelló Pascual. El 3 de noviembre de 1983 avalaban la candidatura de Don Antonio Portolés a esa Medalla, los Académicos de Número Don Román Casares López, Don Leonardo Gutiérrez Colomer y Don Ángel Vián Ortuño. En Junta General de 23 de febrero de 1984, el Doctor Portolés fue nombrado Académico de Número Electo y en 14 de marzo de ese año el Doctor Portolés manifestaba al entonces Director de la Real Academia de Farmacia, Don Ángel Santos Ruiz, que «En la tarea de cada día tendré presente la deuda contraída con la Academia», intención que con su dedicación a la Real Academia cumplió sobradamente, como iremos desvelando en su actividad en la Real Academia, pues era un hombre de Honor.

No tomaría posesión de la Medalla número 8 hasta el 16 de octubre de 1986 con el discurso de recepción titulado *Inmunofarmacología. Nuevos horizontes en Biomedicina y Farmacoterapia*. Le contestó, en nombre de la Corporación, el Académico de Número Doctor Don Alfredo Carrato Ibáñez, quien destacó del recipiendario, «entre muchas otras cualidades positivas, por su tesón en el trabajo y su capacidad para encontrar siempre soluciones idóneas entre los no pocos problemas que ha tenido que resolver», valorando su discurso como una «valiosísima ofrenda... al apasionante capítulo de la Inmunofarmacología (con) inclusión de numerosos datos provenientes de su experiencia propia» y acompañado de una extensa bibliografía.

En su intervención en esta Real Academia con motivo de la Sesión Necrológica en memoria del Doctor Don Rafael Cadórniga Carro, que tuvo lugar el 23 de marzo del año 2000, Don Antonio recordaba no sólo la prestigiosa figura científica del Doctor Cadórniga sino también su método de trabajo en equipo en la Comisión Permanente de Régimen Interior y su colaboración con él en las tareas rectoras de nuestra Corporación. La estima que ambos se tenían era mutua y el Doctor Cadórniga ponderaba incesantemente la actividad de Don Antonio al frente de la Secretaría.

Don Antonio era un hombre de fe, siempre abierto a la esperanza de un mundo mejor, gracias a la Bondad humana y al avance de la Ciencia y la Cultura, así lo afirmaba en el Discurso de la Sesión

Inaugural del Curso 2001, que tituló *Supervivencia e individualidad en Biología*, y que leyó en su lugar el Doctor Don David Martín Hernández el día 18 de enero de ese año, pues decía: «al igual que la inmunidad innata ha protegido al individuo frente al medio ambiente desde la obscura noche de los tiempos... también el comportamiento innato y el adquirido, que está modulado por la educación y la cultura, pueden preservar a nuestra sociedad en el futuro».

II.1. Labor Académica

Don Antonio, desde su incorporación como Académico de Número, fue miembro de la Sección segunda de Biología, que en el año 2002 pasó a denominarse de Biología, Biotecnología y Farmacogenómica, y como tal coordinó la Monografía número tres de Actualización en Ciencias Farmacéuticas titulada *Autoinmunidad. Algunos aspectos básicos y clínicos*, que se publicó en el año 1996.

Por otro lado, en nombre de la Corporación, presentó a numerosos Académicos Correspondientes, entre ellos a los españoles Francisco Díaz-Fierros Viqueira, David Martín Hernández, que más tarde pasaría a ser Académico de Número; Manuel Fresno Escudero, José María Rojo Hernández, José Antonio Abrisqueta Zarrabe, José Olivares Pascual, Guillermo Jiménez Gallego, al que más tarde contestaría en su discurso de recepción como Académico de Número; así como los extranjeros Victoriano Campos Pardo, Fernando Quevedo Ganoza y Rosa Altagracia Ricourt Regús. Esta tarea era particularmente grata para él, puesto que consideraba que era muy interesante la aportación de estos nuevos miembros al debate del saber en «aque- llos campos en los que el impacto de la ciencia puede influir profundamente en la sociedad contemporánea».

Asimismo su compromiso con las tareas de la Real Academia se extendió a otras actividades como miembro de la Comisión de Publicaciones desde el 17 de junio de 1993, de la Comisión de Admisiones desde el 21 de marzo de 2000 y de la Comisión de Bioética desde el 23 de enero de 2003.

II.2. Labor desde la Presidencia de Sección

Don Antonio fue miembro y tuvo a su cargo la Presidencia de la Sección 5.^a de Historia, Bibliografía, Legislación y Deontología desde el 26 de mayo de 1999 hasta el 23 de enero de 2003 en que, a tenor de los Nuevos Estatutos del año 2002, ésta pasó a ser la Sección 6.^a de Historia, Legislación y Bioética, cuya presidencia ostentaba hasta la fecha de su óbito, siendo por tanto miembro nato de la Junta de Gobierno.

Don Antonio era un lector empedernido, un erudito que además era partícipe de la erudición de sus compañeros académicos. Desde esta perspectiva fue el impulsor de que se realizaran Sesiones Conmemorativas como las del II Centenario de la muerte de Lavoisier, centenario del nacimiento de José María Albareda Herrera y el bicentenario del nacimiento de Liebig, que tuvieron lugar respectivamente los días 13 de octubre de 1994, 21 de mayo de 2002 y 6 de octubre de 2003.

Asimismo a él se debe la iniciativa para la publicación en el año 2002 del Volumen primero de la *Historia de la Real Academia de Farmacia* debida al Doctor Toribio Zúñiga y Sánchez-Cerrudo, que se hallaba inédita, y en el año 2003 para la edición en facsímil del tomo primero del *Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles* del Doctor Rafael Roldán y Guerrero, que se encontraba agotado.

Es digno de elogio el entusiasmo que Don Antonio puso para que en el mes de octubre de 2004 tuviera lugar la Exposición de objetos y libros antiguos procedentes del Museo Aboca de Sansepolcro (Italia), que sólo en varios días se mantuvo en nuestra sede y contó con más de dos mil visitantes.

* * *

La participación de Don Antonio en otras actividades de la Corporación se hizo extensiva a la Jornada de Puertas Abiertas de la Real Academia que se celebró el día 28 de octubre de 1992, montando una Exposición de Libros Antiguos de la Biblioteca, en la que tuve el honor de colaborar, y que fue visitada por más de un millar de personas.

Asimismo otra de sus actividades se dirigió durante tres años a la Docencia de Tercer Ciclo en nuestra Academia. Así impartió en los Cursos 1991-1992, 1992-1993 el titulado *Modificación farmacológica de la respuesta inmune* y en el Curso 1993-1994, conjuntamente con los Doctores Ángel Santos y María Cascales, el denominado *Hormonas, citoquinas y otros componentes del sistema inmune en la homeostasis del organismo*.

III. ANTONIO PORTOLÉS: ACADÉMICO SECRETARIO GENERAL

Don Antonio desempeñó el cargo de Académico Secretario, vacante por cese, a petición propia, de Don Manuel Ortega Mata, desde el 29 de mayo de 1991 hasta el 18 de septiembre de 1997 en que cesó, a petición propia, por motivos de salud. Don Antonio llevó a cabo con éxito una gestión llena de peripecias, realizada con mucho esfuerzo personal y sin que trascendiera, dada su humildad. No obstante, el 5 de marzo de 1998, Don Antonio recibió del entonces Director de la Real Academia, Don Julio Rodríguez Villanueva, un homenaje, junto a los que fueron Directores y Secretarios, en el que se le entregó una placa de plata en reconocimiento a la tarea realizada a favor de la Real Academia.

III.1. Las obras en nuestra Sede

Don Antonio se responsabilizó de importantes obras de mantenimiento de nuestra sede, el antiguo «caserón» que tantos recuerdos le traía de sus años de estudiante. Durante el último cuatrimestre de 1991 se ocupó de las obras necesarias para contar en la planta baja del edificio noble con un «Aula de Coloquios» que permitiera desarrollar las diversas actividades académicas y en el primer semestre de 1992 llevó a cabo importantes obras de remodelación en la parte del edificio que estuvo ocupada por el Instituto de Toxicología y que permitieron incorporar al recinto académico una nueva sala de conferencias, una sala para efectuar Juntas de Gobierno, otra para Juntas Generales y espacios donde se ubicaría la Sala de Recuerdos en cuya instalación tuve el honor de colaborar, procediéndose a su

apertura al público el 24 de enero de 1994 tras la Sesión Inaugural del Curso.

En el año 1995, Don Antonio abrió comunicación entre los dos cuerpos del edificio, con lo que se incrementaba la funcionalidad de nuestra sede, mientras que en el año 1996 y 1997 llevó a cabo importantes obras destinadas a la reparación de las humedades. En aquellos años no dudó Don Antonio, sin temor a romperse algún hueso o a intoxicarse con algún desprendimiento gaseoso, en dejarse caer por una trampilla muy estrecha a los sótanos que comunicaban con los colectores para comprobar por sí mismo el estado de las bóvedas subterráneas. Planteó un proyecto de saneamiento integral para evitar el deterioro de los sillares de granito, proyecto que, por motivos económicos, no se llevó a cabo entonces y que a día de hoy ha sido remediado este problema sólo en parte gracias a nuestra actuación por la subvención económica recibida.

La sensibilidad del Doctor Cadórniga, Director de la Corporación, sumada a la del Doctor Portolés, hizo posible que en 1997 nuestro edificio fuera declarado Bien de Interés Cultural, con categoría de Monumento.

III.2. El Ornato de nuestra Sede

Desde 1993 una de las preocupaciones de Don Antonio fue el adorno de nuestra sede, bien con los magníficos reposteros que encargó a la Real Fábrica de Tapices que decoran la entrada a esta sala, bien consiguiendo los cuadros que cedió en depósito la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, o bien con la exhibición de algunas representaciones del lenguaje estético de la ciencia como, por ejemplo, algunos dibujos de Cajal.

III.3. La revista *Anales* y otras publicaciones

En Junta de Gobierno de 26 de septiembre de 1991, se tomó el acuerdo de designar a Don Antonio Director de la revista *Anales*, editor de la Comisión de Aguas Mineromedicinales y «de cuantas publicaciones edite la Corporación».

Don Antonio se hizo cargo de las publicaciones de la Academia con amplia responsabilidad, mejorando la calidad del papel y de la impresión, efectuando las pruebas de imprenta que fueran necesarias. Imprimió su estilo personal a los *Anales*, pues cambió el diseño de la cubierta que desde el número uno de 1993 iba a tener sus señas de identidad, haciendo más sugestiva la presentación de la revista al elegir el fondo gris sobre el que destacaban las letras moradas y una banda longitudinal de igual color a la izquierda. Además incluyó en el texto indicadores de cabecera que facilitaban la localización de los temas y propició una mayor difusión de los artículos doctrinales y de revisión. Don Antonio enriqueció la Comisión de Publicaciones y el Consejo de Redacción de los *Anales* con un Comité Científico Internacional «para mejor atender la demanda de las colaboraciones extranjeras». Asimismo editó seis *Anuarios de la Corporación*.

En cuanto a la Comisión de Aguas Mineromedicinales, Don Antonio siempre prestó su apoyo incondicional para la publicación de los estudios que ésta llevó a cabo sobre los diferentes balnearios españoles y las propiedades de sus aguas, en concreto publicó los de La Toja, Lugo y Blancafort. En 1992 acudió, junto a la Doctora Carmen de la Rosa, Secretaria de dicha Comisión, a las Jornadas de Aguas Minerales y Mineromedicinales, organizadas por el Instituto Geominero de España, donde la Doctora de la Rosa presentó una Ponencia, atendiendo, de manera solícita como lo viene haciendo desde hace muchos años, a los deseos de la Real Academia.

Don Antonio también se hizo cargo de la publicación de las cuatro primeras Monografías de Actualización en Ciencias Farmacéuticas y de los Cuadernos Monográficos que recopilaban las sesiones *In Memoriam* de los Señores Académicos fallecidos.

La sensibilidad de Don Rafael Cadórniga y de Don Antonio hacia la Historia hizo que propiciasen la publicación en 1994 del Facsímil de la obra de Pedro Gutiérrez Bueno titulada *Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica*, que tuve el honor de prologar y que fue seleccionada por el Ministerio de Cultura para ser incluida en la Exposición Bibliográfica titulada «Libros de España», que tuvo lugar en la Biblioteca Nacional de Buenos Aires (República Argentina).

Hoy día nos quedan además sus cinco Memorias de Secretaría en las que se aprecia su encantador y peculiar estilo personal.

III.4. La mejora de la Biblioteca

Con el escaso personal con que contaba la Real Academia durante su mandato, Don Antonio apoyó en todo momento la funcionalidad de esta dependencia y a su responsable en el cargo, el Doctor Vicente Vilas, consiguiéndose en 1995 que Becarias de la Escuela de Biblioteconomía y Documentación de la Universidad Complutense procedieran a la Catalogación e Informatización de parte del Fondo librario que inmediatamente fue incorporado al Catálogo Colectivo del Patrimonio Bibliográfico Español.

Don Antonio donó libros suyos a la Biblioteca y además publicó desde el año 1994 en los *Anales* la relación de las personas que cada año efectuaban donaciones a esta dependencia con lo que propició una labor de mecenazgo entre los Académicos de Número, Académicos Correspondientes y particulares para incrementar el fondo librario.

III.5. El Calendario de Actividades

Don Antonio dinamizó las actividades científicas de la Real Academia, pero no era partidario de la improvisación, y el 24 de febrero de 1992 comunicaba a los Señores Académicos: «esta Secretaría está abierta a cuantas sugerencias de temas le sean propuestos, colaborando en cuantos aspectos de organización estén a su alcance». El resultado fue el incremento notable de la actividad de la Real Academia organizándose cursos, mesas redondas, conferencias y comunicaciones científicas, estableciéndose así un Programa Anual de Actividades Científicas en orden a un criterio de equidad.

III.6. El Archivo fotográfico

Otra iniciativa de Don Antonio fue la creación en el año 1994 de un archivo fotográfico que comprendiera tanto a los Académicos de Número como a los Correspondientes, e incluso a los conferenciantes invitados y sesiones efectuadas, archivo que me encomendó organizar en mi calidad de Académica Vicesecretaria y del que después

se han ocupado los Doctores David Martín y Alberto Giráldez, que me sustituyeron en la Vicesecretaría.

III.7. La Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia

Don Antonio Portolés se sumó con entusiasmo al proyecto del Doctor Rafael Cadórniga para crear una Fundación al objeto de «impulsar y gestionar los proyectos que la Real Academia de Farmacia le proponga». El Acta de Constitución data del 16 de mayo de 1994 en la que figuraban cinco Académicos de Número, los Doctores Rafael Cadórniga, Antonio Doadrio López, Segundo Jiménez, Antonio Portolés y Ángel Vián.

La Fundación inició su andadura con la celebración de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, organizadas para conmemorar el 50 Aniversario de la incorporación de la Real Academia de Farmacia al Instituto de España. Dichas Jornadas tuvieron lugar desde el 24 al 29 de junio de 1996, desempeñando Don Antonio un papel de responsabilidad formando parte del Comité Organizador, gestionando el patrocinio económico de los Ministerios de Educación y Cultura y del Ministerio de Asuntos Exteriores y actuando como Moderador en la Sesión del día 28 de junio que estuvo dedicada a un problema de interés sanitario en los umbrales del siglo XXI como era *El SIDA: Un reto a la Ciencia y a la Sociedad*. Las ponencias presentadas en esta sesión fueron publicadas y estuvieron patrocinadas por la Fundación Anti-Sida de España. Don Antonio efectuó una introducción sobre *El SIDA, una nueva enfermedad viral*, en la que, como siempre, confiaba en que se dejara «entrearbierta una puerta a la esperanza».

Don Antonio se integró en el Patronato de la Fundación, que se ocuparía del gobierno de ésta, actuando como Secretario desde el 20 de marzo de 1997. Don Antonio de nuevo formó parte del Patronato desde el 3 de mayo del año 2000 en su calidad de Académico de Número.

III.8. La Sección de Galicia de la Real Academia de Farmacia

Don Antonio no sólo apoyó la creación de la Sección de Galicia de la Real Academia, hoy elevada al rango de Academia de Farmacia de Galicia, sino que formó parte de la Comisión Especial para el estudio del Anteproyecto de Estatutos de esa Sección que se constituyó el 31 de enero de 1994. La puesta en funcionamiento de la Sección se celebró el 21 de noviembre de 1996 con una sesión inaugural que tuvo lugar en Santiago de Compostela, acto al que Don Antonio asistió y participó representando a la Real Academia junto al Doctor Rafael Cadórniga.

II.9. La devoción al Doctor Ángel Santos Ruiz

Don Antonio prestó una especial devoción al Doctor Ángel Santos, quien fuera su profesor en los tiempos de estudiante y con quien compartió durante un tiempo tareas organizativas en la Real Academia de Farmacia cuando aquél era Director y él Académico Secretario. Buena prueba de ello es la placa que se le dedicó a la entrada del Aula de Coloquios el 2 de julio de 1992.

Don Ángel tenía la mejor opinión de Don Antonio en lo científico y en lo humano, prueba de ello son las palabras que pronunció en el discurso de contestación en la recepción como Académico de Número en la Real Academia de Doctores, puesto que le describe así: «persona de sana curiosidad, alerta a lo que está a su alrededor, que se revela, asimismo, como estudioso de la obra de otros con generosidad, interés y rigor».

Desde el 17 de enero de 1993, Don Ángel fue el Conservador de la Sala de Recuerdos, tarea en la que tuve el honor de colaborar con él y después, según sus deseos, de ocupar dicho cargo. Don Antonio contribuyó a engrosar los fondos de la misma con alguno de los aparatos que creó y utilizó en sus investigaciones, así como con los esmaltes en frío que hoy se exponen en la Sala Segunda del Museo que abrió sus puertas el día 3 de noviembre de este año, con motivo de la Sesión Necrológica en memoria de Don Ángel, para mostrar la obra artística de algunos de nuestros Académicos de Número, así

como el Legado Ángel Santos Ruiz 2005. Soy testigo de que la noticia de dicho Legado del admirado Profesor y Académico de Número más antiguo de la Corporación, le produjo a Don Antonio una honda satisfacción por la persona, por la importancia del mismo y porque veía cumplido el impulso a la labor de mecenazgo que desde el año 1994 labraba al publicar en los *Anales* las donaciones que anualmente se recibían para esta dependencia.

III.10. Jefe de Personal

Don Antonio asumió su función de Jefe de Personal con humanidad y delicadeza, procurando una mejor formación del personal a su cargo. En el año 1992 el entonces conserje Don Julio Feito sufrió una intervención de coronarias y además se vio sujeto a la Ley de Incompatibilidades, por lo que tuvo que pasar a la situación de excedencia voluntaria. Don Antonio influyó para que se promoviera para el cargo a su esposa Doña Josefa Castellanos, al objeto de que el matrimonio no perdiese sueldo ni vivienda y pudiera sacar a flote a su familia.

Asimismo hizo posible que Doña María José Aliaga pudiera realizar, bajo mi dirección, su Tesis Doctoral sobre la *Historia de la Biblioteca de la Real Academia de Farmacia*, contando con la anuencia del Académico Bibliotecario, a la sazón el Doctor Vicente Vilas. La Tesis fue defendida en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en el año 2002 y obtuvo el Premio Santos Ruiz en el Concurso Científico de ese mismo año.

* * *

Don Antonio sirvió generosamente, como hemos visto, tanto a la Real Academia como a los Señores Académicos en su calidad de *Primum inter Pares*, como gustaba recordar en los últimos años el Doctor Segundo Jiménez, y haciendo realidad aquel dicho: *Haec bene si serves, tu longo tempore vives*.

IV. ANTONIO PORTOLÉS, MIEMBRO DE OTRAS ACADEMIAS

La personalidad académica de Don Antonio no quedó circunscrita a los límites de nuestra Corporación, pues fue distinguido con el nombramiento de Miembro Activo de la New York Academy of Sciences en 1965, de Académico de Número de la Sección Farmacia de la Real Academia de Doctores, cuya toma de posesión se produjo el 12 de mayo de 1993 con el discurso titulado: *El reto y el estrés: dos aspectos de la capacidad de adaptación y sus consecuencias para el Sistema Inmune*, que fue contestado, como hemos citado anteriormente, por el Doctor Ángel Santos; y de Académico Correspondiente de la Academia Peruana de Farmacia, que le incorporó el 24 de octubre de 1992 con el discurso de recepción titulado: *Inmuno-Moduladores de Origen Vegetal*, que fue leído por la Doctora María Cascales al no poder él desplazarse a Lima en esa fecha.

* * *

Finalmente no quisiera terminar mi intervención sin expresar mi homenaje personal al Doctor Antonio Portolés, al que recuerdo por su humanidad, su elevado concepto de la responsabilidad, que le hizo ser una persona consecuente y cordial, por su simpatía personal, su carácter alegre, chispeante, como buen madrileño, y positivo, por su ánimo constante, como asistente asiduo que era, en los prolegómenos de las juntas, reuniones y sesiones celebradas en la Corporación, así como por su creatividad en el campo científico y cultural.

Particularmente recuerdo de su tiempo de Académico Secretario, lo gratas que eran las reuniones preparatorias de las Juntas de Gobierno, Juntas Generales y Comisión de Hacienda, en las que reinaba un espíritu de confraternidad, como no podía ser menos en aras del respeto a los Señores Académicos.

Para mí fue un honor tenerle a mi lado en la Audiencia que su Majestad el Rey Don Juan Carlos I ofreció al Pleno de la Real Academia el día 22 de febrero de este año.

Querida María Teresa y familia, pudiera parecer que la figura de Don Antonio había quedado en la penumbra del olvido, pues su nombre no está escrito en piedra, pero habéis de saber que por su Bondad, Buen Hacer y Trato Exquisito, él ocupará siempre un lugar indeleble en nuestra memoria y en nuestros corazones. Descanse en paz.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesión Inaugural del Curso Académico 2006

Orden del día

1. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2005 por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo.
2. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas, Académico de Número, titulado «Europa y la Globalización de la Sanidad».
3. Entrega de Medallas Carracido, categoría Oro, a la Fundación Caja Madrid, categoría Plata, a Doña Rosa Basante Pol, y categoría Bronce, a Don José Antonio Matjí.
4. Toma de Posesión de Académicos Correspondientes.
5. Entrega de Premios del Concurso Científico de 2005.
6. Clausura del Acto.

Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2006



Mesa de la Presidencia (de izda. a dcha.): Doña María Cascales Angosto, Don Salustiano del Campo Urbano, Don Juan Manuel Reol Tejada, Don Alberto Galindo Tixaire y Don Antonio Doadrio Villarejo.

El día 19 de enero de 2006, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió gran solemnidad. Presidió el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia; junto a él, el Presidente del Instituto de España, el Excmo. Señor Don Salustiano del Campo; el Presidente de la Real Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, el Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire; la Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto, y el Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo. De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF hizo la salutación primera

y explicó los éxitos obtenidos por la Academia en el 2005 y los proyectos para el presente año. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2005; a continuación el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre «Europa y la Globalización de la Sanidad».

Posteriormente se hizo entrega de las Medallas Carracido, en su categoría de Oro, a la Fundación Caja Madrid, categoría de Plata a Doña Rosa Basante Pol, y categoría de Bronce a Don José Antonio Matjí. Los distinguidos tuvieron palabras de gratitud para la Academia y subrayaron el honor que para ellos significaba recibir la Medalla Carracido.

Seguidamente se procedió a la Toma de Posesión de los Académicos Correspondientes electos, Doctores: Rafael Lozano Fernández, Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata, Javier León Serrano, Joaquín Pérez Pariente, Ana M.^a Requejo Marcos, Carmen Peña López, Juan Esteva de Sagrera, José Enrique Hours Pérez, José Manuel Giménez Amaya y Vicente Larraga Rodríguez de Vera, siendo llamados por el Secretario e imponiéndoles las medallas apropiadas a su condición. Acto seguido, el Doctor Rafael Lozano Fernández pronunció unas palabras de agradecimiento en nombre de todos los Académicos Correspondientes electos.

Por último se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Cinfa, Premio Faes Pharma, Premio Mabo, Premio Normon, Premio Juan Abelló, Premio Carlos del Castillo Leiva y Premio Santos Ruiz, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores.

El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades, de los Presidentes de las Academias de Farmacia de Cataluña y Galicia.

Clausuró el acto el Presidente de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2006 en nombre de S.M. el Rey.

Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2005

EXCMO. SEÑOR DON ANTONIO DOADRIO VILLAREJO

La Real Academia Nacional de Farmacia inicia oficialmente las actividades correspondientes al Curso 2005 con la Solemne Sesión Inaugural del 20 de enero, contando con la presencia de la Ministra de Educación y Ciencia, Doña M.^a Jesús Sansegundo; el Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo Urbano; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Señor Don Amador Schüller Pérez, y con la lectura del discurso reglamentario, titulado: «Avances en Geobotánica», a cargo del Excmo. Señor Doctor Don Salvador Rivas Martínez.

La Academia distinguió con las Medallas Carracido en su categoría de Oro al Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz, Presidente de Honor de Nuestra Corporación, y al Excmo. Señor Don Eduardo Rodríguez Rovira, ex-Vicepresidente ejecutivo de la Fundación Casares Gil, además de otra de Plata a Don Nicolás Forteza Forteza, que les fueron entregadas en la Sesión Inaugural.

Durante el año pasado ha tenido lugar la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación. El 17 de mayo, toma posesión como Académico de Honor el Excmo. Señor Don Joan Massagué Solé, con la lectura de su discurso: «Oportunidades farmacéuticas en Oncología básica». De Académicos Correspondientes se produjeron cinco tomas de posesión en Sesiones Públicas con las lecturas de sus correspondientes discursos reglamentarios, cuatro de españoles y uno extranjero. El 13 de enero del Profesor Doctor Don José Pío Beltrán Porter (Valencia), el 17 de febrero del Doctor Bart Rombaut (Bélgica), el 14 de abril del Profesor Doctor Don José Enrique O'Connor Blasco (Valencia), el 21 de abril de la Profesora Doctora Doña Juana González Parra (Madrid), el 5 de mayo del Profesor Doctor Don Pedro Fito Maupoey (Valencia); además el Profesor Doctor Don José Antonio Pérez Romero tomó posesión en el despacho del Presidente el 16 de junio y de seis en la sesión inaugural, Doctores Julio Cortijo Jimeno, Elvira Bel Prieto, Agustín Valero

Castejón, Francisco Tomás Lorente, Ángel del Valle Nieto y Consuelo de la Torre García Quintana.

Hemos de hacer mención especial a la pérdida sufrida este año por la Corporación debida al fallecimiento de dos Académicos de Número, los Excmos. Señores Don Ángel Santos Ruiz y Don Antonio Portolés Alonso y de los Académicos Correspondientes Don Jorge Fernández López Sáez, Don Alberto García Ortiz, Don Isidoro Rasines Linares y Don Vicente Martínez Piqueras, además del Profesor Simón Pérez Alva de Perú. Nuestro recuerdo y gratitud por lo mucho que han aportado a esta Corporación.

En relación a la Actividad Científica, ha sido de un extraordinario dinamismo, resumida en 40 Sesiones Científicas semanales, distribuidas en seis Tomas de Posesión, cinco de Académicos Correspondientes y uno de Honor, trece conferencias, ocho Mesas Redondas, dos Tertulias Científicas, dos Exposiciones, siete Necrológicas y dos Presentaciones de Monografías.

La Fundación Casares Gil ha contribuido a este desarrollo con su patronazgo en cuatro importantes Sesiones Científicas; las Mesas Redondas sobre Innovación y Medicamentos, coordinada por el Profesor Monge Vega y que tuvo como ponente invitado al Doctor Prous Cochs y la de «I+D Farmacéutica, los Laboratorios y el papel de las Agencias Reguladoras de Medicamentos», con la presencia de la Doctora Doña M.^a del Val Díez Rodrigálvarez, Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Las dos Sesiones de Inauguración y Clausura de la Exposición Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas, celebradas el 19 de octubre y el 17 de noviembre, respectivamente, tuvieron una especial relevancia y un gran éxito, muestra del cual son las felicitaciones recibidas del Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales y del Ayuntamiento de Burgos, lo que obligó a prorrogar la exposición hasta el 22 de diciembre. En ella, se expuso la obra de Enrique Moles, con cuadros, objetos, artículos originales y material científico de éste, realizando visitas guiadas a grupos de estudiantes y profesionales, que principalmente fueron farmacéuticos. Debemos agradecer especialmente al Profesor González de Posada, como depositario del legado Moles, su fundamental intervención y organización de este evento.

Dentro de estos actos, la Academia rindió su homenaje a dos figuras de las Ciencias farmacéuticas, ratificando como Académico de Honor a Don Obdulio Fernández y nombrando nuevo Académico de Honor, a título póstumo, a Don Enrique Moles. Para situar el momento histórico y para gozar la vida y trayectoria de los Profesores citados, intervinieron, en representación de la Real Academia Española, el Académico de Número Don José Manuel Sánchez Ron, de la Real Academia de la Historia; el Académico de Número Don Luis Miguel Enciso Recio, y en relación directa con la vida y obra de Don Obdulio Fernández, el Profesor Gutiérrez Jodra, Académico de Número y Vicepresidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y el Profesor Jiménez Collado, Académico de Número y Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina.

La actividad de la Academia se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las secciones se reunieron en dieciséis ocasiones y las Comisiones en doce. Además, la Junta de Gobierno tuvo doce sesiones y la Junta General se convocó en catorce ocasiones.

Como es habitual, también este año se ha impartido en la Corporación un Curso del Tercer Ciclo, patrocinado por el Ministerio de Educación y Ciencia y coordinado por el Instituto de España, sobre Bases Moleculares del estrés oxidativo, por la Doctora Cascales Angosto.

Entre otras Actividades Científicas efectuadas por nuestros Académicos en otros foros hay que destacar las realizadas por el Profesor Juan Ramón Lacadena, Académico de Número, que impartió un Curso en el Instituto de España, titulado: «Genética, Bioética, Sociedad».

Este enorme esfuerzo científico tiene su continuación *in extenso*, en el capítulo de Publicaciones, editando cuatro números de los Anales, tres monografías: «Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo», «Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos» y «Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías», con el patronazgo de la Fundación Casares Gil en la segunda y el comienzo de una nueva serie de publicaciones que con el título genérico de «Lecturas Singulares», vio su primer número en el mes de junio con el título: «Del Corazón y

la Mente», conferencia pronunciada el 27 de enero por el Excmo. Señor Don Manuel Losada Villasante, Académico de Honor.

El Museo vio incrementado su patrimonio con el legado de Don Ángel Santos Ruiz, donado por la familia de éste y que ocupa una sala entera con dos nuevas vitrinas donde se expone la vida científica de tan ilustre maestro. Nuestro Museo recibió a 346 visitantes durante el año.

La Biblioteca ha visto terminada sus obras de remodelación y ampliación con una nueva zona noble que ocupa un pasillo lateral de 35 m² antes vacío, y la ampliación de su antigua zona noble con 50 m² del almacén anterior a la Sala de lectura, que ahora quedan unidos como única zona noble. En los 85 m² de nueva zona noble se han instalado nuevos armarios e iluminación perimetral. Estas obras han obligado a trasladar unas 40.000 revistas al sótano, en una zona provista a tal fin con armarios correderos.

Estas obras se han complementado con la instalación de una nueva Red informática con dos Servidores, uno web y otro exclusivo para el programa Absys servidor de catalogación de bibliotecas. El Servidor web aloja el módulo Absys web, a la vez que da servicio a la intranet de la Biblioteca y está preparado para albergar al próximo proyecto de los Anales on line.

El año 2005 ha visto la terminación de la catalogación informatizada de nuestra Biblioteca, contando con un total de 103.617 registros. El catálogo se puede consultar ya desde nuestra página web, siendo pioneros entre las Reales Academias en ofrecer este servicio, que supondrá una enorme mejora en las relaciones con los usuarios de nuestra Biblioteca y que supone un hito histórico.

La página web de nuestra Corporación aumentó en un 34% las visitas con respecto al año 2004, con un total de 1.952.231 visitas. El pasado verano se produjo una remodelación de aquélla, introduciendo además cerca de 600 artículos que fueron indizados.

El año 2005 también ha visto la terminación de la indización de nuestros Anales, desde su creación en 1932, y que se pueden consultar on line desde nuestra web.

El 27 de enero tomaron posesión de sus cargos de Vicepresidenta, la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto; de Vicesecreta-

rio, el Excmo. Señor Don Alberto Giraldez Dávila, que renovaba el cargo, y de Tesorero, el Excmo. Señor Don Albino García Sacristán, que lo hacía por fallecimiento de su titular, el Excmo. Señor Don Segundo Jiménez, por el periodo de un año y que renovaría posteriormente el 1 de diciembre.

El 1 de diciembre era elegido nuevo Secretario de esta Corporación el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo.

La Junta de Gobierno nombró nueva Directora de los Anales a la Profesora Miras Portugal y Vocal representante del Instituto de España al Profesor Rodríguez Villanueva.

Asimismo, el Doctor Román de Vicente es elegido Presidente de la Sección 6.^a de Historia, Legislación y Bioética, vacante por fallecimiento de su titular, el Doctor Portolés.

Durante el año se produjo la elección de nuevos Académicos de Número: Don Mariano Esteban Rodríguez, Don Gonzalo Jiménez Martín, Don Fidel Ortega Ortiz de Apodaca y el Profesor Don José Luis Vila Jato, este último de la Comunidad de Galicia, con lo que la Academia subraya su carácter nacional.

El 2005 ha sido un año repleto de éxitos, tanto para la Institución en sí como para sus miembros a nivel personal. El 22 de febrero, en el Palacio de La Zarzuela, fue recibido en Audiencia Real privada de 40 minutos, el Pleno de nuestra Corporación, para hacer entrega a S.M. el Rey Don Juan Carlos I, de la Medalla de Oro Carracido, en edición especial, máxima distinción de la Real Academia Nacional de Farmacia. La Revista «Noticias Médicas», que lleva cuarenta años en el mundo editorial de las publicaciones médicas, ha elegido este año a la Real Academia Nacional de Farmacia como finalista del Premio Edimsa a la «Institución Sanitaria del Año», y la Junta General de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, acordó en su reunión del 30 de noviembre, conceder el Premio de la Academia en su convocatoria del año 2005 a la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA, por «su estimable colaboración hace cincuenta años, en la fundación de nuestra Academia, y con testimonio de estima y admiración a su incansable labor en pro de las Ciencias Farmacéuticas, estímulo y guía de las Academias de Farmacia».

La Asociación de Academias de Farmacia Iberoamericanas, reunida en Chile, acordó la designación de esta Academia como Sede de su II Encuentro en Madrid 2007.

A nivel personal, destaca la concesión de la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio a la Excm. Señora Doña María Cascales Angosto, que le fue entregada en nuestra Sede por la Ministra de Educación y Ciencia; las medallas de Honor de la Universidad Complutense, a título póstumo a Don Ángel Santos Ruiz y a Don Domingo Espinós; del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos a Don Javier Puerto Sarmiento; la Comenda del Mérito Farmacéutico del Consejo Federal de Farmacia de Brasil a Don Benito del Castillo García; medallas de oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense a los Profesores Mayor Zaragoza, Doadrio Villarejo y a Doña María Cascales Angosto, y las medallas Balnearios de Galicia para Doña Josefina San Martín Bacaicoa y Don Antonio Ramírez Ortega.

Nombramientos de Académico de Honor de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina a nuestro Presidente, Don Juan Manuel Reol Tejada, y de la Real Academia de Ciencias de Sevilla a Don Julio Rodríguez Villanueva; de Número de la Real Academia de Medicina de Salamanca y de la de Doctores a Don Alfonso Domínguez Gil-Hurlé, Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, Don Alfonso Domínguez Gil-Hurlé y a Doña Ana Pascual Leone, Correspondiente de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina a Don Antonio Monge y los nombramientos de Académico Correspondiente de la Real Academia de Bellas Artes de Cádiz, Académico de Honor de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Granada y Miembro Numerario del Instituto de Estudios Canarios, a favor del Profesor González de Posada; de Doctor *Honoris Causae* por la Universidad de León para Don Salvador Rivas Martínez y Don Julio Rodríguez Villanueva; de nuestro Presidente, ratificado como Consejero de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios y nombrado Colegiado de Honor del Colegio de Farmacéuticos de Ciudad Real; de Vocal Asesor del Consejo Nacional de Sanidad a Doña Flora de Pablo Dávila y Copresidente de la Comisión de Alto Nivel de la ONU para la Alianza de Civilizaciones a Don Federico Mayor Zaragoza. La Académica Correspondiente, residente en Chile, Doctora Carmen Sandoval ha sido nombrada

Directora del Centro de Referencia de Salud, creado en la Escuela de Farmacia de la Universidad Andrés Bello de aquel país.

Destacamos asimismo, los importantes premios concedidos a dos Académicos de Número, el Premio de la CEOE de Ciencias a Doña M.^a Teresa Miras Portugal, y del Centro de Estudios Salmantinos a Don José A. Cabezas Fernández del Campo.

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

Por último, no podemos dejar de hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia, puesto que las subvenciones concedidas en este Curso 2005, aunque tardías, nos han permitido acometer las actividades programadas. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los patrocinadores del Concurso Científico, y a los Patronos y miembros de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación.

Muchas gracias por su atención.

Madrid, 19 de enero de 2006.

El Académico Secretario
ANTONIO DOADRIO VILLAREJO

Concurso Científico. Relación de Premiados 2005

PREMIO DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Beatriz Cubelos Álvarez.

Por su trabajo titulado: *Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia: Mecanismos moleculares del transporte de glicina en las sinapsis glutamatérgicas.*

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS

Mirandeli Bautista Ávila y David Andrés García.

Por su trabajo titulado: *El bloqueo selectivo de las células de Kupffer atenúa la hepatotoxicidad y acelera la regeneración hepática inducidas experimentalmente.*

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

Paqui G. Través y Sonsoles Hortelano.

Por su trabajo titulado: *Efectos antiinflamatorios de diterpenos sintéticos derivados del ácido acantoico.*

PREMIO ALCALÍBER

Desierto.

PREMIO CINFA

M.^a Ángeles Gómez del Río, M.^a Isabel Sánchez Reus, Irene Iglesias Peinado y Juana Benedí González.

Por su trabajo titulado: *Influencia de un extracto de Hypericum perforatum en la toxicidad inducida por rotenona, en un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas.*

PREMIO FAES PHARMA

Marta Rodero Martínez.

Por su trabajo titulado: *Anisakis simples: Purificación antigénica y desarrollo de nuevas técnicas de inmunodiagnóstico in vivo e in vitro.*

PREMIO MABO

Rafael Mayoral Moñibas y Paloma Martín Sanz.

Por su trabajo titulado: *La prostaglandina E2 promueve migración y adhesión de células de carcinoma hepatocelular.*

PREMIO NORMON

Elena Pérez Hernando y Luis A. del Río Álvarez.

Por su trabajo titulado: *Propuesta al formulario nacional como fórmula magistral tipificada de un colirio de ciclosporina 2.*

PREMIO JUAN ABELLÓ

Miguel Vaquero, Lucía Núñez, Ricardo Caballero, Ricardo Gómez y Eva Delpon.

Por su trabajo titulado: *Efectos de la atorvastatina sobre las corrientes de potasio responsables de la repolarización auricular humana.*

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA

Juan Pablo Hervás Pérez, Marta Sánchez-Paniagua López, Beatriz López-Ruiz y Enrique López Cabarcos.

Por su trabajo titulado: *Biosensor amperométrico para la determinación de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida.*

PREMIO SANTOS RUIZ

M.^a Rosa Virto García.

Por su trabajo titulado: *Optimización mediante modificaciones farmacotécnicas de matrices poliméricas. Desarrollo de formulaciones alternativas.*

Sesiones Científicas

12 de enero

A las 19,00 horas, Toma de Posesión como Académico de Número del Excmo. Señor Doctor Don Gonzalo Giménez Martín (medalla 11), quien pronunció su discurso titulado: «Omnis Cellula e Cellula». Fue contestado por el Excmo. Señor Don Manuel Ruiz Amil.

19 de enero

A las 19,00 horas, Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia. Discurso reglamentario a cargo del Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas: «Europa y la Globalización de la Sanidad».

26 de enero

A las 19,00 horas, Toma de Posesión como Académico de Número del Excmo. Señor Doctor Don Mariano Esteban Rodríguez (medalla 33), quien pronunció su discurso titulado: «Los interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes». Fue contestado por la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto.

2 de febrero

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre la gripe aviar. Ponentes: Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona: «Prevención de la gripe aviar». Excmo. Señor Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo: «Gripe aviar: Situación actual. Peligrosidad y eventuales remedios».

9 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia por el Excmo. Señor Doctor Don Francisco González de Posada, titulada: «Ángel del Campo y Enrique

Moles: pilares de la renovación de la Química española». Acto de la Fundación Casares Gil, cierre del I Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas.

16 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia a cargo del Profesor Doctor Don Joaquín Pérez Pariente: «Materiales mesoporosos como matrices para la liberación controlada de fármacos».

23 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia por el Profesor Doctor Don José Miguel Ortiz Melón: «La diversidad funcional de proteína fosfatasa-1 y su papel en la regulación celular».

2 de marzo

A las 19,00 horas, Conferencia por el Doctor Don Miguel Fernández Braña, Académico Correspondiente: «Sulfonamida: el grupo mágico».

9 de marzo

A las 19,00 horas, Sesión Solemne de Toma de Posesión como Académico de Número del Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato, quien leyó su discurso titulado: «Nanotecnología farmacéutica: Una galénica emergente». Fue contestado en nombre de la Corporación por el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

16 de marzo

A las 19,00 horas, Mesa Redonda de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de Puente Viesgo (Can-

tabria). Intervinieron: M.^a Carmen Francés Causapé: «Historia del Balneario». Carmen de la Rosa: «Estudio microbiológico», y Miguel Ladero: «Entorno botánico».

23 de marzo

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre «Estrategias en la investigación de fármacos: Situación actual». Ponentes: Doctor Emilio Díez de Glaxo SmithKline y Doctor Fernando Peláez de MSD.

30 de marzo

A las 19,00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente de la Doctora Eva Delpón Mosquera, que disertó sobre: «Regulación por óxido nítrico de los canales iónicos cardiacos que determinan la fase 2 de los potenciales de acción». La presentación fue a cargo del Académico de Número Excmo. Señor Don Ángel Villar del Fresno.

Noticias

La Asociación de Academias de Farmacia Iberoamericanas, reunida en Chile, acordó la designación de esta Academia como Sede de su II Encuentro en Madrid 2007.

* * *

El 12 de enero tomó posesión de su plaza de Académico de Número, el Excmo. Señor Don Gonzalo Giménez Martín, con la lectura de su discurso reglamentario: «Omnis Cellula e Cellula». El Presidente de la Corporación le hizo entrega de la medalla número 11.

* * *

El 19 de enero tuvo lugar en nuestra Sede la Sesión Solemne de Inauguración del Curso Académico 2006, bajo la Presidencia del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Corporación, y la asistencia presidencial del Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo, y del Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire.

* * *

El 26 de enero tomó posesión de su plaza de Académico de Número, medalla 33, el Excmo. Señor Don Mariano Esteban Rodríguez, quien pronunció su discurso titulado: «Los interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes». Fue contestado en nombre de la Corporación por la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto.

* * *

Nos comunican el 6 de febrero, el nombramiento de nuestro Presidente, Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, como Académico de Honor de la Academia de Farmacia de Galicia.

* * *

El 16 de febrero fue elegido nuevo Bibliotecario de nuestra Corporación, el Excmo. Señor Don Antonio Ramón Martínez Fernández.

* * *

El 23 de febrero fue elegido nuevo Académico de Número el Doctor Joan Guinovart, Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Parque Científico de Barcelona.

* * *

El 23 de febrero renovaron su mandato los Excmos. Señores Don Ángel Villar y Don Bernabé Sanz como Presidentes de las Secciones 4.^a y 5.^a

* * *

El 2 de marzo renovaron su mandato como Presidente de la Sección 1.^a, el Excmo. Señor Don Antonio Monge Vega, y fue elegido nuevo Presidente de la Sección 2.^a el Excmo. Señor Don Juan Ramón Lacadena Calero, en sustitución del actual bibliotecario.

* * *

El día 9 de marzo tomó posesión de su plaza de Académico de Número, el Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato, con la lectura de su discurso: «Nanotecnología farmacéutica: Una galénica emergente». Fue contestado en nombre de la Corporación por el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

* * *

El lunes 13 de marzo se celebró en nuestra Sede una Sesión de la Asamblea Amistosa Literaria (fundada por Jorge Juan) y presidida por el Excmo. Señor Don Guillermo Perinat y Escrivá de Romaní, Conde de Casal, junto al Secretario General de nuestra Academia, para dar posesión como miembro de ella a Don Leonardo Villena Pardo. La *laudatio* corrió a cargo del Excmo. Señor Don Francisco

González de Posada, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina y Correspondiente de la nuestra.

* * *

El día 15 de marzo, en nuestra Sede, se entregaron los Premios AEFLA en su XXV Edición. El acto fue presidido por el Presidente de nuestra Corporación, Doctor Reol Tejada, junto al Académico Secretario, Doctor Doadrio Villarejo; el Doctor Uriach, como representante de los patrocinadores; Don Pedro Capilla, Presidente del Consejo General de Colegios Farmacéuticos, y Don José Félix Olalla, Presidente de AEFLA. Este acto fue de especial relevancia, en cuanto se estableció un encuentro entre el mundo académico, el profesional y el humanístico farmacéutico desde nuestra Institución.

* * *

El Profesor José Luis Lastres, Académico Correspondiente de nuestra Corporación, fue investido Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia el jueves 16 de marzo, en la Sede de esa Institución.

* * *

El día 23 de marzo fue reelegido en su cargo de Presidente de la Sección 6.^a, el Excmo. Señor Don Román de Vicente Jordana, y elegido nuevo secretario el Excmo. Señor Don Gonzalo Giménez Martín.

* * *

Del día 27 al 29 de marzo se impartió en nuestra Sede un curso de Validación de métodos analíticos por la Asociación de Farmacéuticos de la Industria, AEFI.

* * *

El 30 de marzo tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente, la Doctora Doña Eva Delpón Mosquera, con la exposición de su conferencia: «Regulación por óxido nítrico de los canales iónicos cardíacos que determinan la fase 2 de los potenciales de acción». Fue presentada por el Académico de Número, Excmo. Señor Don Ángel Villar del Fresno.

Necrológica

En nombre de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile cumpló el penoso deber de despedir en su viaje a la eternidad al doctor Hermann Schmidt-Hebbel. Su deceso se produce a unas pocas horas de iniciarse este año 2006, luego de una prolongada enfermedad que lo tuvo recluido, primero en su casa y luego en el Hogar Alemán durante un largo tiempo. Soportó con estoicismo y buena disposición esta dolorosa realidad que lo alejó de las innumerables tareas que desarrollara durante su extensa y tan prodigiosamente productiva vida.

Al tratar de hilvanar algunas palabras, en esta ocasión tan dolorosas, se agolpan en el corazón y en la mente una multitud de sentimientos y recuerdos que dificultan, por una parte, la necesaria condición de brevedad de esta alocución y, por otra, la apropiada selección de ellos en momentos en que nos invade una gran congoja por su partida. Hay muchos hechos, acontecimientos, iniciativas, propuestas, actividades en sus más de noventa años de su residencia en la tierra, que han sido relevantes, significativos y trascendentes.

Muchos lo recordarán por su dilatada carrera académica desempeñada en la Universidad de Chile en las Facultades de Química y Farmacia, de Filosofía y Educación, de Veterinaria y Ciencias Pecuarias y en Universidades de otros países. Hace apenas unas cuantas semanas asistimos a un acto, desarrollado dentro del marco de las XIV Jornadas de Nutrición, organizadas por la Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, oportunidad en que se le distinguió con un homenaje especial que daba crédito a su pionera y visionaria labor en pro de estas disciplinas, tanto en el país como en el extranjero, y se recordó su labor fundacional de la Sociedad y de la revista que da cuenta de las actividades de ella.

Recibió muy joven su título de químico farmacéutico de la Universidad de Chile, viajó luego becado a Alemania, obteniendo allí el título de Químico Bromatólogo y el grado de doctor, convirtiéndose, de esta manera, en uno de los primeros profesores de la Universidad de Chile en ostentar este grado académico.

Una multitud de profesionales recibieron sus enseñanzas durante los más de cincuenta años en que ejerció el magisterio universitario. Centenares de ellos se formaron en investigación en las diferentes disciplinas que cultivó durante su trayectoria académica. Su trabajo científico en el campo de los alimentos fue trascendente y se proyecta en nuestros días en la investigación de numerosos profesionales que se desempeñan tanto en el campo académico como en los ámbitos industrial, regulatorio, de gestión y de control. Clásico es ya su trabajo sobre composición de los alimentos chilenos que con la coautoría de Irma Pennacchiotti, Lilia Masson y otros colaboradores destacados se ha venido publicando y perfeccionando en varias ediciones perfeccionadas y puestas al día el presente.

Siempre nos asombró su extraordinaria eficiencia en el trabajo, por la cantidad y variedad de temas que abordaba, y que ejecutaba siempre con ejemplar y envidiable diligencia, prontitud y oportunidad. Escribía con facilidad, claridad y sencillez. Publicó más de veinte obras sobre su especialidad y otras variadas materias, pulcras, bien documentadas y elegantes.

Su principal actividad universitaria la desarrolló en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile. Formó parte del primer claustro de profesores y se desempeñó como Secretario de la Facultad recién creada, cargo que sirvió durante varios períodos, asumiendo posteriormente como Director de la Escuela de Química y Farmacia.

En un período particularmente complejo de la vida institucional del Colegio Químico Farmacéutico fue necesario efectuar una reestructuración completa de su directiva, que permitiera dar una adecuada continuidad a la institución y que contara con el apoyo de toda la profesión. Se constituyó entonces un nuevo Consejo General y se eligió para dirigirlo a una personalidad de prestigio y jerarquía indiscutibles, fue en esas condiciones que el profesor Schmidt-Hebbel asumió la presidencia de la orden, cargo que desempeñó con su acostumbrada eficiencia y sentido de equidad y justicia. Me correspondió colaborar estrechamente con el presidente en dicho Consejo. Algún tiempo después formamos parte del equipo directivo de la Facultad con don Luis Ceruti como Decano, el Doctor Schmidt como Director de la Escuela, correspondiéndome desempeñar el cargo de Secretario de la Facultad.

Juntos tomamos la iniciativa de crear la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile, lo que se concretó con ocasión de la celebración de la II Reunión Latinoamericana de Ciencias Farmacéuticas en diciembre de 1982. Lógicamente, naturalmente, fue elegido como su primer Presidente, cargo que desempeñó hasta 1994.

Su sólida formación en los principios y su permanente adhesión a los valores cristianos lo hicieron un hombre generoso y reconocido de los dones y oportunidades que le otorgó la vida. Hace ya varios años que la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile es depositaria de la Fundación Hermann Schmidt-Hebbel, para la cual el doctor ha provisto un fondo que permite otorgar una beca a un estudiante de bajos recursos de la carrera de química y farmacia de la Universidad de Chile. Ha querido, con esta iniciativa, corresponder al beneficio que le permitiera completar mediante una beca sus estudios en Alemania.

Su trayectoria académica ha contado con reconocimientos en el país y en el extranjero a través de una cantidad impresionante de distinciones de parte de sociedades científicas, profesionales y universidades. Bástenos aquí señalar las de Profesor Emérito y Medalla Juvenal Hernández que recibió de la Universidad de Chile.

El doctor Schmidt-Hebbel, junto con Juan Ibáñez, César Leyton y Luis Ceruti son las personalidades de mayor jerarquía y relevancia de la Farmacia en el medio universitario y profesional de nuestro país. Forma con ellos una pléyade magnífica de gigantes de la profesión, referentes indiscutidos de la historia de la Farmacia del Siglo Veinte en nuestro medio y arquetipo de comportamiento académico, profesional y ciudadano para las generaciones futuras.

Tuve el privilegio de gozar de su amistad y conocer a su hermosa familia que formó con su esposa Gisela y sus hijos Klaus y Marion y sus cinco nietos. A ellos presentamos nuestras más sentidas condolencias personales y de la Academia.

La Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile ha desempeñado un importante papel desde su creación en el desarrollo y progreso de las ciencias y la profesión farmacéuticas. Estoy seguro de interpretar a todos sus miembros al expresar que nos embarga una pena muy grande y nos acongoja muy profundamente el deceso de nues-

tro primer presidente. Sentimos no sólo el dolor por su partida de este mundo, sino que sentimos, todavía mucho más, el de tener que afrontar el futuro sin su siempre equilibrado juicio y atinados consejos.

Profesor Schmidt, Maestro, compañero, colega y amigo, descansa en paz.

AQUILES ARANCIBIA ORREGO
Presidente de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile

Bibliografía

Un linaje hidalgo en las localidades de Salamanca y Zamora: Su auge, declive y evolución durante los últimos cinco siglos.—Cabezas Fernández del Campo, J. A.—2006.—Salamanca, Centro de Estudios Salmantinos y Diputación Provincial de Salamanca.—ISBN: 84-86820-25-5.—232 págs.

El Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, ha donado a la Biblioteca de la Corporación un nuevo libro de carácter histórico que ha editado este año 2006. Se trata de un estudio genealógico de quienes ostentaron el apellido Campo o Fernández del Campo que, procedentes de Burgos y Cantabria, se expandieron por el Norte de Salamanca y Sur de Zamora. Como afirma Quintín Aldea en el Prólogo, el estudio abordado por el Doctor Cabezas Fernández del Campo, «puede servir de paradigma de cómo se fue formando el tejido demográfico de la sociedad española de tiempos pasados».

El autor ha realizado para su estudio, que abarca desde 1492 hasta 1933 y está ordenado cronológicamente, una búsqueda documental principalmente en los Libros Parroquiales de poblaciones de Salamanca y Zamora, en los Archivos Diocesanos de Salamanca y Zamora, en el Archivo Municipal y Registro Civil de Ledesma, en la Real Chancillería de Valladolid, en los Archivos de la Excm. Diputación de la Provincia de Salamanca y en el de Protocolos Notariales de Salamanca.

En la Introducción el autor trata «Sobre la condición de Hidalgo», y después en diez capítulos va desgranando los vástagos del apellido, sus datos biográficos, así como los diferentes lugares de su asentamiento. El primero de estos capítulos está dedicado a «Los Fernández del Campo de tierras cántabras y burgalesas»; el segundo a «La villa salmantina de Ledesma, solar de otro tronco Fernández del Campo, y su relación con las localidades de Moraleja y La Sagrada»; el tercero a «El primer pleito de hidalguía mantenido por los Fernández del Campo de Ledesma y Moraleja (1545-1522)»; el cuarto a «Los Fernández del Campo de Ledesma y su vinculación con Moraleja/La Sagrada (1484-1618)»; el quinto a «Los Fernández del

Campo de la villa salmantina de Palacios del Arzobispo y pueblos próximos (1619-1669). Segundo pleito por su hidalguía (1668-1670)»; el sexto a «Expansión de los Fernández del Campo en localidades de la zamorana tierra del vino (1670-1798)»; el séptimo a «Pleitos de Hidalguía de los Fernández del Campo zamoranos durante el siglo XVIII y principios del XIX»; el octavo a «Los Fernández del Campo de varias localidades salmantinas entre 1670 y 1800 y pleitos por ellos promovidos y por los del Norte de España en el siglo XVIII»; el noveno a «Los Fernández del Campo de localidades salmantinas y zamoranas durante los siglos XIX y XX», y el décimo a «Alfa y Omega de un linaje hidalgo castellano-leonés».

El estudio es completado por el autor con un Anexo que contiene una Tabla preliminar que es un índice de las Tablas que siguen a continuación con indicación de datos, años y abreviaturas utilizadas. Siguen las Tablas I a XXXIV, que ocupan de la página 124 a la 191, que incluyen la relación de vástagos desde 1418 a 1799, así como localización de los documentos de referencia, las Tablas XXXV a XXXVII, que ocupan de la página 192 a la 195, en las que se citan datos de menor significación genealógica comprendidos entre 1592 y 1800, y las Tablas XXXIX a LXXI, que comprenden de la página 196 a 229, en las que aparecen datos posteriores a 1800.

El autor expone que muy posiblemente el escudo de los Fernández del Campo proviene del hecho de descender de caballeros que tomaron parte en la batalla de Baeza, ganada a los moros el día de San Andrés, 30 de noviembre de 1227, por Fernando III. Asimismo otras conclusiones deduce de su estudio, como son los posibles traslados y asentamientos durante los siglos XVII y XVIII, los posibles casamientos entre parientes, mantenidos desde el siglo XVI hasta el siglo XX, el posible crecimiento económico de algunos en el siglo XIX, debido a la adquisición de bienes procedentes de las desamortizaciones, la transformación en la segunda mitad del siglo XIX y segundo tercio del siglo XX desde terratenientes/ganaderos, hidalgos a profesionales universitarios, pero verificándose un descenso en los portadores del apellido debido a diferentes causas.

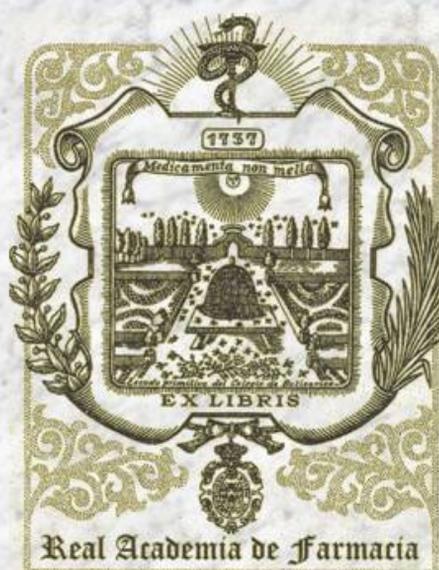
El Doctor José Antonio Cabezas del Campo ha cumplido con esta publicación con su objetivo de conocer más de cerca su linaje y como él mismo dice encontrar «una explicación de por qué, cómo

y cuándo se produjo su expansión desde Ledesma en el siglo XVI o su declive en cuanto a número de descendientes y su evolución al desaparecer el estamento de hidalgos en el siglo XIX».

M.^a DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Fe de erratas

Se ha apreciado la siguiente errata en la página 991 del número 4 de los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia del año 2005. Donde dice: «Falleció el día 23 de marzo de 2005», debe decir: «Falleció el día 23 de abril de 2005».



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com