

INSTITUTO DE ESPAÑA

**ANALES**  
de la  
**REAL ACADEMIA**  
**NACIONAL**  
**DE**  
**FARMACIA**



2006

VOLUMEN LXXII

Núm. 4

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID



## Aberrant mRNA Stability Regulation in Human Diseases

Recibido el 30 de noviembre de 2006

ISABEL LÓPEZ DE SILANES\* and MANEL ESTELLER\*  
*Cancer Epigenetics Laboratory, Spanish National Cancer Center  
(CNIO), 28029 Madrid, Spain*

### ABSTRACT

mRNA stability is emerging as a fundamental and effective cellular tool to regulate gene expression at posttranscriptional levels. mRNA stability is controlled via orchestrated interactions between mRNA structural components (*cis*-elements) and specific *trans*-acting factors. The most widespread and efficient determinant of RNA stability are the adenylate and uridylate-rich elements (ARE) that, through binding of ARE-binding proteins (AUBPs), modulate the stability of transcripts and/or their translation. Alterations in any of these components can lead to disease. Here, we review the genetic alterations in 3'UTR regulatory sequences as well as the aberrant levels, subcellular localization, and posttranslational modifications of AUBPs that are linked to human diseases. A thorough understanding of these alterations and their impact on mRNA stability regulation will uncover promising new targets for therapeutic intervention.

**Key words:** Post-transcriptional gene regulation.—RNA-binding proteins.—AU-rich elements (ARE).—ARE-binding proteins (AUBPs).—Cancer.—Inflammation.—Thalassemia.—Alzheimer disease.

---

\* Corresponding authors:

Isabel López de Silanes: [ilsilanes@cnio.es](mailto:ilsilanes@cnio.es)

Manel Esteller: [mesteller@cnio.es](mailto:mesteller@cnio.es)

Cancer Epigenetics Laboratory, Spanish National Cancer Center (CNIO).  
Melchor Fernández Almagro, 3 - 28029 Madrid (Spain).

Telf.: +34 91 224 20 27. Fax: +34 91 224 69 23.

## RESUMEN

### Regulación anormal de la estabilidad del ARNm en enfermedades humanas

La estabilidad del ARN mensajero está surgiendo como instrumento celular fundamental y efectivo para regular la expresión génica a nivel post-transcripcional. La estabilidad del ARNm se controla vía interacciones coordinadas entre componentes estructurales del ARNm (elementos *cis*) y factores *trans* específicos. Los determinantes de estabilidad de ARNm más conocidos y eficientes son los elementos ricos en adenina y uridina (ARE) que, a través de su unión con proteínas de unión a ARE (AUBPS), modulan la estabilidad de los transcritos y/o su traducción. Alteraciones en cualquiera de estos componentes puede dar lugar a enfermedades. Aquí revisamos las alteraciones genéticas en elementos regulatorios del 3'UTR, así como las aberraciones en los niveles, localización subcelular y modificaciones post-traslacionales de AUBPs que están asociadas a enfermedades humanas. Un conocimiento detallado de estas alteraciones y su impacto en la regulación de la estabilidad del ARNm revelará nuevas dianas para su aplicación terapéutica.

**Palabras clave:** Regulación génica post-transcripcional.—Proteínas de unión a ARN.—Elementos enriquecidos en AU (ARE).—Proteínas de unión a ARE (AUBPs).—Cáncer.—Inflamación.—Talasemia.—Enfermedad de Alzheimer.

## INTRODUCTION

The regulation of gene expression is a fundamental cellular process that is controlled at multiple levels. While the study of gene regulation has traditionally focused on transcription as a major regulator of gene expression, it has recently become apparent that the posttranscriptional control of gene expression may play an equally important role. Posttranscriptional events comprise pre-mRNA processing, nucleo-cytoplasmic export, mRNA localization, mRNA stabilization and translational regulation (1). Due to the impact that each of these steps can have on gene expression, each of them is tightly regulated. The mechanisms underlying this regulation, still poorly understood, involve mRNA structural components (*cis* elements) and *trans*-acting factors [primarily RNA-binding proteins and non-coding RNAs (e.g., miRNAs)]. Therefore, alterations in any of these levels can have a profound impact on global RNA levels and have been related to numerous pathologies including cancer, inflammatory and autoimmune diseases, developmental defects, and neurodegenerative diseases (2-5).

The posttranscriptional processes that affect the mRNA are regulated by the orchestrated interactions between mRNA structural components (*cis* elements) and specific *trans*-acting factors. Well-characterized RNA sequence elements can be found throughout the body of mRNAs including the 5'-untranslated region (5'UTR), the coding region, and the 3'UTR (Fig. 1A). Most RNA sequence elements [e.g., the 5'-cap structure and the 3'poly(A) tail] are universally present in all mRNAs and direct constitutive processes without apparent selectivity of one mRNA relative to another. However, specific RNA elements have been identified which affect the stability and/or translation of given subsets of mRNAs. The vast majority of such specific RNA sequences are present in the 3'UTR; among them, the best characterized are regions rich in adenine and uridine residues known as AU-rich elements (ARE). AREs have been identified in the 3'UTR of a variety of short-lived mRNAs, including those encoding oncogenes and growth factors, cell-cycle regulatory proteins, cytokines, and inflammatory mediators. AREs frequently, though not always, contain a variable number of AUUUA pentamers, sometimes harbored within a U-rich region. The canonical motifs identified for RNA-binding proteins HuR and TIA-1 (6, 7) consist of a combination of primary sequence and secondary structure in the 3'UTR. AREs are well known to influence stability and are increasingly recognized to affect translation (8, 9). The RNA levels of many of ARE-containing mRNAs are altered in pathological situations such as cancer and inflammation due to abnormal mRNA stabilization and /or translation processes. It is crucial, therefore, to understand the regulation of these «ARE-containing genes» because of their demonstrated involvement in human diseases (2-5).

*Cis*-elements serve as binding sites for a variety of RNA-binding proteins that modulate posttranscriptionally mRNA levels. Of particular interest for this review is the family of RNA-binding proteins that associate to the ARE-determinants (AUBPs). AUBPs regulate, among other processes, the mRNA stability (in a positive way such as the mRNA-stabilizing HuR or negative, like the mRNA-destabilizing AUF1 and TTP) and translation (e.g., TIA inhibiting translation or HuR, enhancing mRNA translation) of ARE-containing mRNAs. At least 12 ARE-BPs (see Table 1) have been identified so far. Most AUBPs are predominantly nuclear proteins that shuttle

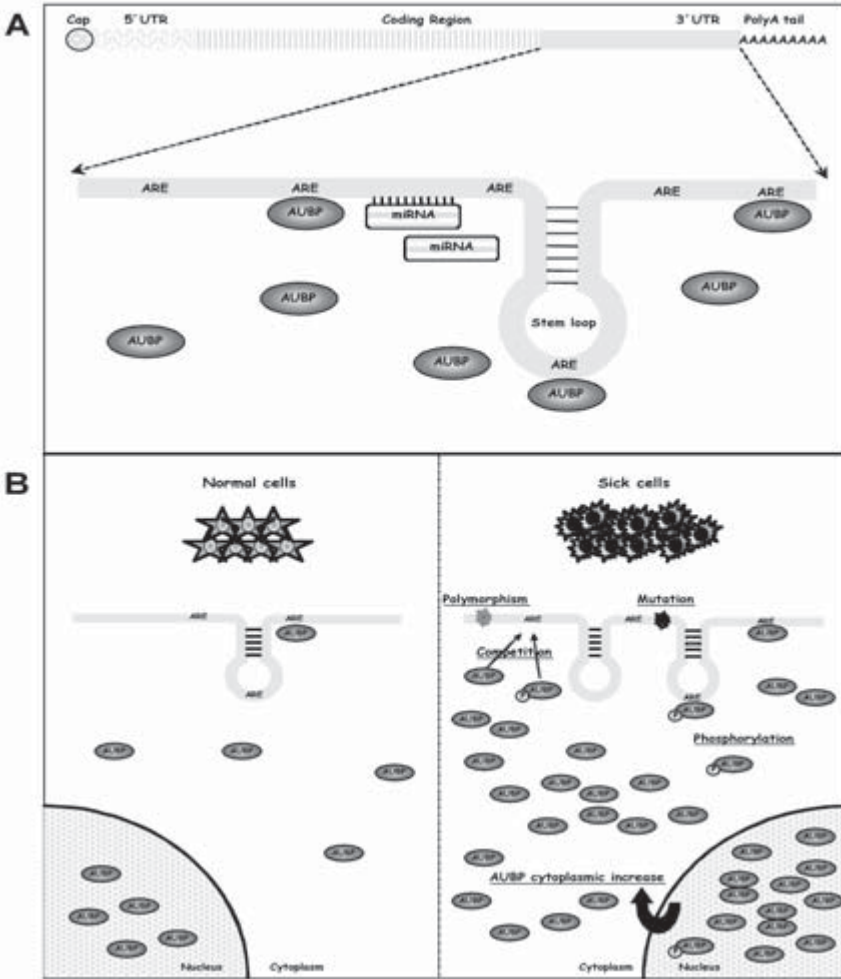


FIGURE 1. *mRNA stability determinants and their alterations in human diseases.* (A) Schematic of the different regions in the mRNA. The 3'UTR is enlarged to show the cis-elements (e.g., AREs) that are found in this region and the trans-acting factors (e.g., AUBPs, and miRNA) that associate to them. (B) In defective cells, two main groups of alterations affect mRNA stability and/or translation: 1) Genetic alterations in ARE such as mutations, deletions, translocations and polymorphisms and 2) Altered regulation of AUBPs such as global increase of AUBPs, changes in their subcellular localization (e.g., increased cytoplasmic levels of AUBPs in cancer), aberrant pattern of posttranslational modifications (e.g., phosphorylation) and altered competition for binding between AUBPs. AUBPs: AU-rich binding proteins. ARE: AU-rich elements. miRNA: microRNAs.

between the nucleus and the cytoplasm. Their cytoplasmic presence appears to be intimately linked to their influence upon target mRNAs and hence AUBPs localization has been the subject of gene expression studies, specially in cancer. AUBPs are also targeted for posttranslational modifications, influencing AUBP ability to bind to target mRNAs as well as their subcellular location. Increasing evidence supports the notion that several RNA-binding proteins can bind to a common ARE-containing target mRNA on both distinct, nonoverlapping sites, and on common sites in a competitive fashion. It is becoming increasingly apparent that the composition and fate (stability, translation) of ribonucleoprotein complexes depend on the target mRNA of interest, RNA-binding protein abundance, stress conditions, and subcellular compartment. While AUBPs regulate numerous posttranscriptional aspects of the mRNA (such as splicing, mRNA localization, and mRNA storage), this review will focus on the literature describing their influence on mRNA stability and translation (8-10).

Given the aforementioned involvement of 3'UTR *cis*-elements and *trans*-acting factors in dictating mRNA stability and translation, it is easy to envision how alterations in any of these components can have a major impact on mRNA half-life and/or translation. In turn, defective mRNA turnover can cause abnormal stabilization or decay of mRNAs, while dysregulated translation can elevate or lower translation rates. Together, these anomalous processes will result in aberrant levels of expressed protein and hence metabolic changes leading to disease. Defective mRNA half-life and translation can arise from 1) Mutations in regulatory *cis*-elements (e.g., AREs) such as single-point mutations, large deletions/insertions and polymorphisms, and 2) alterations in *trans*-acting factors (e.g., AUBPs) such as defective expression and/or subcellular localization of *trans*-acting factor, altered pattern of posttranslational modifications, and aberrant competition among AUBPs which will ultimately influence their net influence upon the fate of the mRNA (stabilization, translation) (Fig. 1B). In human diseases, alterations in both *cis*-elements and *trans*-acting factors have been described (2-5). The purpose of this review is, therefore, to examine the altered mRNA stability and/or translation regulation mediated, mainly, by ARE determinants that can be found in human diseases. Identifying

such alterations and studying how they modify cell biology will help to better understand the mechanisms involved in human diseases and will facilitate the development of novel therapeutic modalities.

TABLE 1. *List of AU-rich binding proteins (AUBPs)*

RNA-binding protein	Official name	Gene Symbol & (Ref Seq)	Subcellular localization	Function	Target mRNAs (examples)
HuR	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i> )-like 1 (Hu antigen R)	ELAVL1 (NM_001419)	Mainly nuclear (ubiquitous)	mRNA stabilization (1), translational enhancer (2)	c-fos (1), c-myc (1), p21 (1), COX-2 (1), TNF- $\alpha$ (1), cyclin A, B1, D1 (1), iNOS (1), IL-3 (1), MyoD (1), p53 (2)
HuB	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i> )-like 2 (Hu antigen B)	ELAVL2 (NM_004432)	Mainly nuclear (neuronal and sex glands)	mRNA stabilization (1), translational enhancer (2)	GLUT1 (1 and 2), NF-M (2)
HuC	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i> )-like 3 (Hu antigen C)	ELAVL3 (2 isoforms: NM_001420; NM_032281)	Mainly nuclear (neuronal)	mRNA stabilization	VEGF, c-myc
HuD	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i> )-like 4 (Hu antigen D)	ELAVL4 (NM_021952)	Mainly nuclear (neuronal)	mRNA stabilization (1), translational enhancer (2)	GAP-43 (1), MARCKS (1), Msi-1 (1 and 2)
AUF1	heterogeneous nuclear ribonucleo-protein D	hnRNPD (4 isoforms: NM_031370; NM_031369; NM_002138; NM_001003810)	Isoforms p42 and p45 are nuclear; p37 and p40, nucleocytoplasmic	mRNA destabilizing	c-myc, GM-CSF, cyclin D1, GADD45, bcl-2, cyclin D1

*Numbers in brackets of each individual target mRNAs refer to the matched function shown for each specific RNA-binding protein.*



TABLE 1. *List of AU-rich binding proteins (AUBPs) (cont.)*

RNA-binding protein	Official name	Gene Symbol & (Ref Seq)	Subcellular localization	Function	Target mRNAs (examples)
TTP	Tristetraprolin	TTP (NM_003407)	Nuclear (20%) and cytoplasmic (80%)	mRNA destabilizing (1), decapping (2)	PAI-2 (1), TNF- $\alpha$ (1), COX-2 (1), GM-CSF (2)
TIA-1	cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1 (NM_022173)	Mainly nuclear	Translational repressor (1), alternative RNA processing (2)	COX-2 (1), TNF- $\alpha$ (1), Fos (2)
TIAR	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	TIAL1 (NM_003252) KHSRP (NM_003685)	Mainly nuclear	Translational repressor (1), alternative RNA processing (2)	IL-8 (1), iNOS (1), $\beta$ 2-AR (1), GADD45 (1), calcitonin/cGRP (2)
KSRP	KH-type splicing regulatory protein		Mostly nuclear	mRNA destabilizing (1), RNA splicing (2)	c-fos (1), c-jun (1), IL-2 (1), TNF- $\alpha$ (1), iNOS (2)
BRF1	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1 (NM_004926)	Nuclear and cytoplasmic	mRNA destabilizing	cIAP2, IL-3
NF90	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3 (3 isoforms: NM_004516; NM_012218; NM_153464)	Mainly nuclear	mRNA stabilization (1), Translational repressor (2)	IL-2 (1), acid beta-glucosidase (2)
CUG-BP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	CUGBP2 (3 isoforms: M_001025076; NM_001025077; NM_006561)	Mainly nuclear	RNA editing (1), mRNA stabilization (2) and translational silencer (3)	Apolipoprotein B (1), COX-2 (2 and 3)

*Numbers in brackets of each individual target mRNAs refer to the matched function shown for each specific RNA-binding protein.*

## DEFECTIVE mRNA STABILITY REGULATION IN HUMAN DISEASES

Several human diseases, outlined below, are associated to mutations in 3'UTR mRNA stability determinants or to alterations in the regulation of 3'UTR-binding regulatory proteins. Next, specific examples will be given to illustrate both aspects.

## Cancer

In cancer, most studies have sought to identify mutations in the coding region and very few naturally occurring mutations in noncoding areas have been described to date. Genetic alterations in 3'UTR sequences can modify the binding properties of *trans*-acting factors and lead to deregulation in protein production. The examples below illustrate the importance of the genetic alterations in AREs in promoting malignancy and its usefulness in determining cancer therapy. The first example described was for the oncogene *c-fos* and its viral counterpart *v-fos*. The coding region of both *c-fos* and *v-fos* is identical differing only in a missing 67-bp (that contains a ARE) in the *v-fos* 3'UTR. Consequently, *v-fos* mRNA is more stable than *c-fos* mRNA and this may account in part for its higher oncogenic potential (11). Other naturally alteration in AREs have been described such as the disruption of the 3'UTR during the integration of Human papillomavirus type 16 (HPV-16), 3'UTR rearrangement of Cyclin D1 and translocation and deletion of ARE in the proto-oncogene *c-myc*, all of them linked to malignant transformation. 3'UTR polymorphism also affect mRNA stability as it has been found for the thymidylate synthase (TYMS) gene. The polymorphism in the 3'UTR consists of the deletion (D)/insertion (I) of a 6-bp stretch (TTAAAG). The D allele showed decreased message stability compared to the I allele due to increased binding to the decay-promoting protein AUF1 (12). In agreement with this finding, colorectal tumors from D-allele carriers have decreased intratumoral TYMS mRNA levels (13) suggesting that the 3'UTR polymorphism can have an impact on the efficiency of TYMS-targeted chemotherapy treatment. Another relevant example is a novel single-nucleotide polymorphism (SNP) in the human dihydrofolate reductase (DHFR) gene that influences mRNA expression levels as well.

Other commonly found alteration in cancer is the frequently elevated levels of RNA-binding proteins as it has been documented for the mRNA-stabilizing protein HuR, and the destabilizing AUF1 and TTP in a wide variety of malignancies (6, 14-16). Depending on the type of tumor, AUBPs with similar functions (e.g., AUF1 and TTP) can have oncogenic or tumor suppressor activities (15, 16). These studies suggest that AUBP play a central role in cancer by

binding to mRNAs encoding proteins involved in malignant transformation, and inducing or repressing their expression by altering mRNA stability and/or translation rates. Moreover, the cytoplasmic abundance of AUBPs (e.g., HuR and AUF1) increases with malignancy (6, 17). This is particularly relevant since the cytoplasmic presence of AUBPs seems to be linked to its stabilizing/destabilizing function. Wnt activation, the tumor suppressor protein von Hippel Lindau (VHL), and AMP-activated protein kinase (AMPK) are responsible for the cytoplasmic distribution of AUBPs and their pathways are also altered in cancer (18-20). Posttranslational modifications of RNA-binding proteins can affect their ability to bind to target mRNAs as well as their subcellular location as it has been shown with the phosphorylation of AUF1 and KSRP. Cell signaling events may also alter mRNA stability, translation and AUBP abundance. For instance, the MAPK pathway affects mRNA stability and translations through the differential phosphorylation of RNA-binding proteins (21). Importantly, several RNA-binding proteins can bind to a common ARE-containing target mRNA on both distinct, nonoverlapping sites, and on common sites in a competitive fashion. For instance, IL-8 plays an integral role in promoting the malignant phenotype in breast cancer and its production is directly influenced by inflammatory cytokines in the tumor microenvironment. In keeping with this notion, activation of the IL-1 receptor on malignant breast cancer cells strongly induced IL-8 mRNA levels. HuR, KSRP and TIAR were found to bind to one or more locations within the IL-8 3'UTR although the association of the stabilizing factor HuR was 20-fold greater than that of the destabilizing factor KSRP (22).

### **Inflammation and autoimmunity**

Several proteins that are encoded by ARE-containing transcripts are critical components of the effector phase of inflammatory and autoimmune diseases. Of particular importance is tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), one of the principal mediators of the inflammatory response in mammals. In addition to its well-known role in acute septic shock, it has been implicated in the pathogenesis of graft-versus-host disease, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and the cachexia that accompanies cancer and the acquired

immunodeficiency syndrome. Many evidences supports the impact of ARE sequences on the posttranscriptional regulation of TNF- $\alpha$  biosynthesis. Macrophages from mice with a genomic deletion of the TNF- $\alpha$  ARE exhibit spontaneous production of TNF- $\alpha$  and their TNF- $\alpha$  mRNA has a substantially prolonged half-life. Remarkably, they also spontaneously develop a chronic inflammatory arthritis and Crohn's disease-like intestinal inflammation. In these studies, it was shown that the absence of ARE-dependent translational control of TNF mRNA was associated with the inability of p38/SAPK and JNK/SAPK signalling pathways to regulate its translational activation. The binding of a number of AUBPs to the ARE sequences are directly responsible of the destabilization of the TNF- $\alpha$  mRNA. TIA-1 and TTP are AUBPs that prevent the pathological expression of tumor necrosis factor alpha, TIA inhibiting its translation and TTP promoting the degradation of TNF- $\alpha$  transcripts and, in turn, functioning as arthritis suppressor genes (23). Therapies such as neutralizing antibodies to TNF- $\alpha$  and chimeric soluble TNF- $\alpha$  receptor have demonstrated efficacy against some of these conditions in clinical trials. Furthermore, the TNF- $\alpha$  ARE is also known to be a target for the mRNA stabilizing factor HuR, and mutations of this *cis*-element both impair HuR binding and decrease TNF- $\alpha$  protein production. Post-transcriptional mechanisms also regulate the production of other proteins involved in inflammatory responses such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrixmetalloproteinase-13 (MMP-13). Pharmacologic inhibitors of COX-2 are potent, anti-inflammatory agents, which significantly reduce the severity of inflammatory arthritis.

Polymorphisms in the 3'UTR of multiple immune related mRNAs are also associated with the development of human autoimmune disease. For instance, deficient TCR  $\zeta$  chain on the T cells of patients with systemic lupus erythematosus appears to be due to an alternatively spliced form of the  $\zeta$  chain mRNA that has reduced stability. As a consequence, these cells display abnormal TCR-induced early signaling and have diminished IL-2 production (3).

## Thalassemia

Thalassemia is a hereditary anemia resulting from defects in hemoglobin production. It is considered the most common genetic disorder worldwide. Thalassemia is clinically heterogeneous because multiple genetic lesions have been described to variably impair globin-chain synthesis. In the normal adult, hemoglobin A, which is composed of two alpha and two beta globins ( $\alpha_2\beta_2$ ), is the most prevalent, comprising about 95% of all hemoglobin. The thalassemias are classified according to which chain of the globin molecule is affected. An  $\alpha$ -globin gene variant, a constant spring ( $\alpha^{\text{cs}}$ ), is the most common cause of nondeletional  $\alpha$ -thalassemia worldwide. The  $\alpha^{\text{cs}}$  mutations harbor a single nucleotide substitution at the wild-type  $\alpha$ -globin mRNA ( $\alpha^{\text{WT}}$ ) translational stop codon (UAA to CAA). This mutation allows the ribosomes to translate into the normally ribosome-free 3'UTR, causing a major decrease in  $\alpha$ -globin mRNA half-life. Searching for the mechanisms responsible for the accelerated decay of the  $\alpha^{\text{cs}}$  mRNA, Morales and colleagues found that the  $\alpha^{\text{cs}}$  mRNA poly(A) tail was significantly shorter than the  $\alpha^{\text{WT}}$  mRNA poly(A) tail. Therefore, reduced  $\alpha^{\text{cs}}$  mRNA half-life appeared to be linked to accelerated 3' terminal deadenylation (24). Moreover, insertion of a stop codon into the  $\alpha^{\text{cs}}$  immediately upstream of the  $\alpha^{\text{cs}}$  mutation prevented ribosome entry into the 3'UTR and stabilized the  $\alpha^{\text{cs}}$  mRNA. This data supported a model in which a stability determinant was present in the 3'UTR and could be affected by the elongating ribosome (25). In fact, analysis of this region identified three cytosine-rich (C-rich) segments [also known as pyrimidin-rich element (PRE)] that contributed to  $\alpha$ -globin mRNA stability when studied in transfected erythroid cells. Subsequently *in vitro* studies demonstrated assembly of a sequence-specific ribonucleic-protein (RNP) complex at this site. Members of the  $\alpha$ -globin poly(C)-binding protein ( $\alpha$ CP) were identified as essential protein components of the  $\alpha$ -complex. In patients who have the  $\alpha^{\text{cs}}$  mutant, read through translation of the 3'UTR prevents the PCBP from binding to the C-rich elements. *In vitro* studies suggested that additional proteins may also contribute to  $\alpha$ -complex structure and/or function. Of particular interest was the identification of the ARE binding/degradation factor AUF1 and poly(A)-binding protein (PABP) as interacting partners of  $\alpha$ CPs (25).

## Alzheimer disease

Dysregulated synthesis and deposition of extracellular amyloid-beta ( $A\beta$ ) within the central nervous system is a major characteristic of Alzheimer disease (AD).  $A\beta$  is derived from proteolytic processing of one of multiple amyloid precursors protein (APP) isoforms. Cleavage of the APPs generates the  $\beta/A4$  peptide, the major component of amyloid in senile plaque. In addition to the altered  $A\beta$  levels, APP mRNA levels are elevated in brain tissue of AD patients, and transgenic mice that overexpress APP mRNA and protein have accelerated  $A\beta$  deposition. The 3'UTR of APP mRNA contains a contiguous 29-base C + U-rich region that appears necessary and sufficient to control the degradation of the mRNA. Purification studies identified two RNA-binding proteins that recognize the APP sequence element (26). One is nucleolin and the other the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (hnRNP C), a nuclear protein that binds U-rich RNA sequences. In cell-free mRNA decay assays, addition of nucleolin accelerates degradation of APP mRNA, while addition of hnRNP C stabilizes APP mRNA (27). Recently, immunohistochemical studies have found the presence of other AUBPs, hnRNP A2 and B1, in brains of patients with AD. In any event, like ARE-mRNAs, the cellular decay rate of APP mRNA may reflect a competition between destabilizing versus stabilizing proteins. One might envision that tipping the balance to stabilization might predispose neural tissue to APP overproduction and possibly AD (28).

## Viral infections

The ability to regulate cellular gene expression is a key aspect of the life-cycles of a diverse array of viruses. In fact, viral infection often results in a global shutoff of host cellular gene expression, being host and viral mRNA stability control critical during viral infection. For instance, simple herpes virus (HSV-1) achieves host-shutoff through the complementary actions of two viral proteins, ICP27 and virion host shutoff (vhs), that inhibit cellular mRNA biogenesis and trigger global mRNA decay, respectively. Although most cellular mRNAs are thus depleted, some instead increase in

abundance after infection; perhaps surprisingly, some of these contain AU-rich instability elements (AREs) in their 3'-untranslated regions. ARE-containing mRNAs normally undergo rapid decay; however, their stability can increase in response to signals such as cytokines and virus infection that activate the p38/MK2 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. HSV-1 infection stabilizes the ARE mRNA encoding the stress-inducible IEX-1 mRNA. Whether the IEX-1 mRNA stabilization is carried out by vhs or through the activation of p38 by ICP27 remains to be clarified (29).

The presence of AU-rich elements in the 3'UTR of viral genomes adds an additional level of regulation. Thus, direct interactions between RNA-binding proteins and viral RNA can alter viral RNA stability and viral protein expression in a manner favorable for viral survival. AU-rich elements have been identified in the late 3'UTR of the human papilloma virus (HPV-1) and HPV31 genomes, in the E6 and E7 oncogenes of HPV-16, in the 3'UTR of hepatitis C virus and certain alphaviruses and in the 5'UTR AU-rich region of the gag gene of human immunodeficiency virus (HIV-1). Several of these regions are binding sites for HuR and the stability of the RNAs is inversely proportional to the levels of cellular HuR expression (30).

### **Other diseases**

Alterations in the regulation of mRNA stability processes in other types of diseases have been reported as well. For instance, mutations that increase mRNA degradation provoking the absence of factor VIII mRNA (F8) in haemophilia A (31); binding of the Y box-binding factor-1 (YB-1) to ARE in GM-CSF mRNA, enhancing GM-CSF-dependent survival of eosinophils that are central in the pathogenesis of asthma (32); polymorphisms between 2 ARE that increase protein binding to the allele ARE2, causing a faster degradation of PPP1R3 mRNA that, in turn, lowers the concentration of the protein implicated in insulin resistance, and thus increasing the risk for development of type 2 diabetes (33); and finally, it has been found reduced expression of sGC subunits in animal models of genetic hypertension because of reduced binding to the mRNA-stabilizing protein HuR compared to normal animals (34).

## mRNA STABILITY AS A TARGET FOR THERAPY

By gaining a more detailed knowledge of the 3'UTR regulatory sequences and the *trans*-acting factors specifically binding to them it will be possible to design effective therapies. As noted earlier, a 6-bp polymorphism in the 3'UTR of thymidylate synthase decreases mRNA levels (13) and, thereby could be useful in predicting the efficacy of TYMS-targeted chemotherapy treatment. TNF- $\alpha$  is effective in the treatment of advanced solid tumors such as melanoma and soft tissue sarcoma. When analyzing mRNA levels of 22 genes in tumor biopsies from patients treated with doxorubicin alone or combined with TNF- $\alpha$ , TIA-1 was the only gene differentially expressed between the two groups. When TNF- $\alpha$  effects were tested *in vitro* in endothelial cells, fibroblasts, CTLs and NK cells, TIA-1 became upregulated only in endothelial and NK cells. These findings could indicate that TNF- $\alpha$  -induced TIA-1 overexpression might sensitize endothelial cells to proapoptotic stimuli present in the tumor microenvironment and enhance NK cell cytotoxic activity against cancer cells (35). The chemotherapeutic agent Prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>) causes growth arrest associated with decreased cyclin D1 in several cell lines. PGA<sub>2</sub> leads to the destabilization of cyclin D1 mRNA via a 3'UTR element that binds the RNA-binding protein AUF1 (36). These studies underscore the potential importance of understanding 3'UTR regulation in cancer therapy.

Alteration on mRNA stability rates might possibly be cured by pharmacological approach by correcting the stabilization/degradation mRNA rates. The specific approach, eventually, would be targeting the correct mRNA since AUBPs bind to a wide variety of mRNA targets and exogenous compound might affect a broad array of genes. If there is an increased in mRNA stabilization, in order to decrease the RNA levels, the ARE subregion can be targeted by antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) or ribozymes. By contrast, when the mRNA is destabilized by mutations or altered binding to RNA degradation-promoting AUBPs, synthetic oligoribonucleotides (ORNs) are worth considering since they do not activate catabolic processes like ODNs. The hybridization of ORN to ARE sequences might insulate/protect ARE from «contact» with cellular *trans*-acting factors (AUBPs) and the exosome (machinery



responsible for mRNA degradation). More interesting will be the use of sense-oriented ORNs that are not supposed to interact with the homologous RNA but might compete for the sequestration of *trans*-acting factor and exosome, inhibiting in this way the target mRNA degradation (37).

The p38 MAPK signaling pathway plays an important role in inflammation and other physiological processes. There are four p38 MAPKs:  $\alpha$  and  $\beta$ , which are 75% homologous, and  $\gamma$  and  $\delta$  which are more distant relatives. Inflammatory stimuli activate four major intracellular signaling pathways: the nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) pathways and the three MAPK pathways (ERK, JNK and p38). All four drive transcription of inflammatory genes. The p38 pathway is also involved in posttranscriptional regulation, and stabilizes inflammatory response mRNAs and promotes their translation through ARE in the 3'UTR of the mRNAs. Posttranscriptional regulation of TNF- $\alpha$  and cyclooxygenase-2 mRNAs by p38 have been extensively investigated and several examples were already shown in this review. Because inhibiting p38 MAPK suppresses production of key inflammatory mediators, it was obvious to search for inhibitors of p38 MAPK for therapy of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, chronic obstructive pulmonary disease and psoriasis. The most widely used are pyridinyl imidazole compounds such as SB203580 and SB202190. The potential of p38 as a drug target has led to development of large collection of inhibitors by pharmaceutical companies. Preclinical studies have largely used model of arthritis, and several inhibitors are now in human trials. Adverse effects of inhibition are hard to predict but immunosuppression is likely. Targets upstream or downstream could also be used to block the MAPK pathway although to date they have not been reported (38).

Furthermore, a number of approaches that exploit RNA's structural dynamics and sequence-specific binding abilities (RNA interference, antisense RNA) are already in place to modulate gene expression. However, there is increasing need for developing synthetic riboregulators that can be integrated into biological networks to function with a wide array of genes and yield insights into RNA-based cellular processes. Isaacs and colleagues were able to engineer riboregulators that both repress and activate translation

*in vivo*, enabling precise control of gene expression through highly specific RNA-RNA interactions (39). Moreover, the administration of riboregulators (3'UTR fragments) such as the one from the prohibitin RNA, effectively controlled tumor cellular proliferation *in vivo* and induced systemic antitumor immunity in rat models (40).

### FUTURE PERSPECTIVES

The examples given above represent compelling evidences for the involvement of alterations in 3'UTR mediated functions in the pathogenesis of different diseases and emphasize the notion that control exerted via the 3'UTR mRNA is crucial for the correct regulation of gene expression. A systematic search for «3'UTR-mediated diseases» is needed since, in the past, virtually all efforts were focused on the coding region. For instance, the involvement of the 3'UTR in controlling mRNA translation during both male and female gametogenesis and in early embryonic development, and as such post-transcriptional controls are essential to these processes, it is a reasonable assumption that certain reproductive disorders will be found to belong to this class of diseases. Additionally, the identification of putative additional «3'UTR-mediated diseases» will require the improvement and development of new methods *in vitro* and *in vivo* to assess the interaction between *cis*-elements and *trans*-acting factors as well as their kinetics. A more detailed understanding of 3'UTR regulatory events through increased efforts directed towards the study of this region and the development of adequate analytical methods will aid in the design of novel chemotherapeutic venues.

### ACKNOWLEDGMENTS

ILdS is supported by Fondo de Investigación Sanitaria grant (PI061653) from Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain).

## REFERENCES

- (1) MOORE, M. J. (2005): From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*. 309: 1514-1518.
- (2) AUDIC, Y. and HARTLEY, R. S. (2004): Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell*. 96: 479-498.
- (3) SEKO, Y.; COLE, S.; KASPRZAK, W.; SHAPIRO, B. A. and RAGHEB, J. A. (2006): The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 5: 299-305.
- (4) HOLLAMS, E. M.; GILES, K. M.; THOMSON, A. M. and LEEDMAN, P. J. (2002): mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem. Res.* 27: 957-980.
- (5) CONNE, B.; STUTZ, A. and VASSALLI, J. D. (2000): The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular «hotspot» for pathology? *Nat. Med.* 6: 637-641.
- (6) LÓPEZ DE SILANES, I.; FAN, J.; YANG, X.; ZONDERMAN, A. B.; POTAPOVA, O.; PIZER, E. S. and GOROSPE, M. (2003): Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene*. 22: 7146-7154.
- (7) LÓPEZ DE SILANES, I.; GALBAN, S.; MARTINDALE, J. L.; YANG, X.; MAZAN-MAMCZARZ, K.; INDIG, F. E.; FALCO, G.; ZHAN, M. & GOROSPE, M. (2005): Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol. Cell. Biol.* 25: 9520-9531.
- (8) ESPEL, E. (2005): The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16: 59-67.
- (9) GUHANIYOGI, J. and BREWER, G. (2001): Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 265: 11-23.
- (10) BARREAU, C; PAILLARD, L. and OSBORNE, H. B. (2005): AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?. *Nucleic Acids Res.* 33: 7138-7150.
- (11) MILLER, D.; CURRAN, T. and VERMA, I. M. (1984): c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell*. 36: 51-60.
- (12) PULLMANN, R. JR.; ABDELMOHSEN, K.; LAL, A.; MARTINDALE, J. L.; LADNER, R. D. and GOROSPE, M. (2006): Differential stability of thymidylate synthase 3'UTR polymorphic variants regulated by AUF1. *J. Biol. Chem.* 281: 23456-23463.
- (13) MANDOLA, M. V.; STOEHLMACHER, J.; ZHANG, W.; GROSHEN, S.; YU, M. C.; IOBAL, S.; LENZ, H. J. and LADNER, R. D. (2004): A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. 14: 319-327.
- (14) BLAXALL, B. C.; DWYER-NIELD, L. D.; BAUER, A. K.; BOHLMAYER, T. J.; MALKINSON, A. M. and PORT, J. D. (2000): Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Mol. Carcinog.* 28: 76-83.
- (15) GOUBLE, S.; GRAZIDE, F.; MEGGETTO, F.; MERCIER, P.; DELSOL, G. and MORELLO, D. (2002): A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res.* 62: 1489-1495.

- (16) STOECKLIN, G.; GROSS, B.; MING, X. F. & MORONI, C. (2003): A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene*. 22: 3554-3561.
- (17) BREWER, G.; SACCANI, S.; SARKAR, S.; LEWIS, A. and PESTKA, S. (2003): Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1. *J. Interferon. Cytokine Res.* 23: 553-564.
- (18) BRIATA, P.; ILENGO, C.; CORTE, G.; MORONI, C.; ROSENFELD, M. G.; CHEN, C. Y. and GHERZI, R. (2003): The Wnt/beta-catenin->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs. *Mol. Cell.* 12: 1201-1211.
- (19) GALBÁN, S.; MARTINDALE, J. L.; MAZAN-MAMCZARZ, K.; LÓPEZ DE SILANES, I.; FAN, J.; WANG, W.; DECKER, J. and GOROSPE, M. (2003): Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7083-7095.
- (20) WANG, W.; FAN, J.; YANG, X.; FURER-GALBAN, S.; LÓPEZ DE SILANES, I. VON KOBBE, C.; GUO, J.; GEORAS, S. N.; FOUFFELLE, F.; HARDIE, D. G.; CARLING, D. and GOROSPE, M. (2002): AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3425-3436.
- (21) BRIATA, P.; FORCALES, S. V.; PONASSI, M.; CORTE, G.; CHEN, C. Y.; KARIN, M.; PURI, P. L. and GHERZI, R. (2005): p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol. Cell.* 20: 891-903.
- (22) SUSWAM, E. A.; NABORS, L. V.; HUANG, Y.; YANG, X. and KING, P. H. (2005): IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3' untranslated region: Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR. *Int. J. Cancer.* 113: 911-919.
- (23) PHILLIPS, K.; KEDERSHA, N.; SHEN, L.; BLACKSHEAR, P. J. and ANDERSON, P. (2004): Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor alpha, cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 2011-2016.
- (24) MORALES, J.; RUSSELL, J. E. and LIEBHABER, S. A. (1997): Destabilization of human alpha-globin mRNA by translation anti-termination is controlled during erythroid differentiation and is paralleled by phased shortening of the poly(A) tail. *J. Biol. Chem.* 272: 6607-6613.
- (25) WAGGONER, S. A. and LIEBHABER, S. A. (2003): Regulation of alpha-globin mRNA stability. *Exp. Biol. Med.* 228: 387-395.
- (26) ZAIDI, S. H. and MALTER, J. S. (1995): Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 3'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA. *J. Biol. Chem.* 270: 17292-17298.
- (27) WESTMARK, C. J. and MALTER, J. S. (2001): Up-regulation of nucleolin mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells by extracellular-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 1119-1126.
- (28) BREWER, G. (2002): Messenger RNA decay during aging and development. *Ageing Res. Rev.* 1: 607-625.

- (29) CORCORAN, J. A.; HSU, W. L. and SMILEY, J. R. (2006): Herpes simplex virus ICP27 is required for virus-induced stabilization of the ARE-containing IEX-1 mRNA encoded by the human IER3 gene. *J. Virol.* 80: 9720-9729.
- (30) FAN, X. C.; MYER, V. E. and STEITZ, J. A. (1997): AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes Dev.* 11: 2557-2568.
- (31) OLDENBURG, J. and EL-MAARRI, O. (2006): New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int. J. Hematol.* 83: 96-102.
- (32) KHABAR, K. S. (2005): The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 25: 1-10.
- (33) XIA, J.; BOGARDUS, C. and PROCHAZKA, M. (1999): A type 2 diabetes-associated polymorphic ARE motif affecting expression of PPP1R3 is involved in RNA-protein interactions. *Mol. Genet. Metab.* 68: 48-55.
- (34) KLOSS, S.; RODENBACH, D.; BORDEL, R. and MULSCH, A. (2005): Human-antigen R (HuR) expression in hypertension: downregulation of the mRNA stabilizing protein HuR in genetic hypertension. *Hypertension* 45: 1200-1206.
- (35) MOCELLIN, S.; PROVENZANO, M.; LISE, M; NITTI, D. and ROSSI, C. R. (2003): Increased TIA-1 gene expression in the tumor microenvironment after locoregional administration of tumor necrosis factor-alpha to patients with soft tissue limb sarcoma. *Int. J. Cancer.* 107: 317-322.
- (36) LIN, S.; WANG, W.; WILSON, G. M; YANG, X., BREWER, G., HOLBROOK, N. J. and GOROSPE, M. (2000): Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7903-7913.
- (37) BEVILACQUA, A.; CERIANI, M. C.; CAPACCIOLI, S. and NICOLIN, A. (2003): Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J. Cell. Physiol.* 195: 356-372.
- (38) SAKLATVALA, J. (2004): The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4: 372-377.
- (39) ISAACS, F. J.; DWYER, D. J.; DING, C.; PERVOUCHINE, D. D.; CANTOR, C. R. and COLLINS, J. J. (2004): Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat. Biotechnol.* 22: 841-847.
- (40) MANJESHWAR, S.; BRANAM, D. E.; LERNER, M. R.; BRACKETT, D. J. and JUPE, E. R. (2003): Tumor suppression by the prohibitin gene 3'untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res.* 63: 5251-5256.



## El hipérico: una fuente de compuestos bioactivos con un amplio espectro de acción

Recibido el 13 de noviembre de 2006

BEATRIZ MARTÍNEZ POVEDA<sup>1</sup>, MARÍA ISABEL AMORES-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, ANA RODRÍGUEZ QUESADA<sup>1</sup>, MIGUEL ÁNGEL MEDINA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.*

<sup>2</sup>*Centro de Salud Estación de Cártama, Avenida Manuel de Falla, s/n. Estación de Cártama, Cártama (Málaga)*

### RESUMEN

El hipérico es una planta herbácea cuyos extractos han sido usados tradicionalmente para el tratamiento de muy diversas afecciones. Recientemente, se ha demostrado que los extractos de hipérico son efectivos para el tratamiento de la depresión leve a moderada. El hipérico es fuente de gran diversidad de compuestos bioactivos, siendo la hiperforina el principal causante de sus efectos antidepresivos. Otro compuesto característico del hipérico, la hipericina, es el más potente fotoactivador natural descrito. El renovado interés en el hipérico como fuente de compuestos con potencial aplicación farmacológica ha permitido caracterizar nuevos y prometedores efectos de la hiperforina y la hipericina, en particular como antitumorales y antiangiogénicos. Este trabajo revisa la etnobotánica del hipérico, con sus usos tradicionales y clínicos actuales, así como resume el estado actual del conocimiento acerca de los efectos biológicos de sus dos compuestos más característicos, la hipericina y la hiperforina.

---

\* Contacto: Doctor Miguel Ángel Medina, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. 29071-Málaga (España). Teléfono: +34 952 13 71 32. Correo electrónico: medina@uma.es

**Palabras clave:** Hierba de San Juan.—Hipericina.—Hyperforina.—Angiogénesis.—Fotoactivador.—Antidepresivo.—Antitumoral.

### ABSTRACT

#### **Hypericum: a source of bioactive compounds with a wide range of action**

St. John's wort is a herbaceous plant, which extracts have been traditionally used for the treatment of a high number of pathological conditions. Recently, it has been shown that St. John's wort extracts are effective for the treatment of mild-to-moderate depression. St. John's wort is a source of a great diversity of bioactive compounds, hyperforin being the main responsible for the described antidepressant effects. Another characteristic compound is hypericin, the most potent natural photoactivator described so far. The renewed interest for St. John's wort as a source of compounds with potential pharmacological applications has allowed to characterize new and promising effects of hyperforin and hypericin, mainly as antitumoral and antiangiogenic compounds. This work reviews St. John's wort ethnobotanics, along with its traditional and current clinical uses, as well as the current state-of-the-art of the biological effects of both hypericin and hyperforin.

**Key words:** St. John's wort.—Hypericin.—Hyperforin.—Angiogenesis.—Photoactivator.—Antidepressive.—Antitumoral.

### **ETNOBOTÁNICA DEL HIPÉRICO: DATOS BOTÁNICOS, USOS TRADICIONALES Y CLÍNICOS ACTUALES**

El hipérico o hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* L.) es una planta herbácea perenne con una amplia distribución en Europa, Asia occidental, norte de África y Norteamérica (Figura 1). Se han descrito más de 400 especies de plantas pertenecientes al género *Hypericum*, que a su vez pertenece a la familia de las Clusiáceas (también denominadas Hipericáceas y Gutíferas). La planta del hipérico puede alcanzar un porte de hasta 60 cm. Sus hojas presentan unos «puntos pelúcidos» fácilmente observables al verlas al trasluz. Estos «puntos» no son realmente agujeros en las hojas sino unas «glándulas aceitosas» constituidas por una fina capa de resinas y aceites esenciales incoloros. Las flores son de color amarillo dorado, se disponen en corimbo terminal y presentan cinco sépalos en su cáliz y cinco pétalos (de longitud doble que la de los sépalos) en su corola. Los pétalos están salpicados de puntitos negros que cuando se frota entre los



dedos los dejan teñidos de rojo. Es ese líquido rojo el que contiene los principales compuestos biológicamente activos.



FIGURA 1. *El hipérico o hierba de San Juan (Hypericum perforatum).*

Una de las primeras citas del hipérico se remonta al año 79 a.C., cuando Plinio el Viejo comenta que los antiguos griegos y romanos solían colocar ramas de esta planta en su hogares encima de estatuas o imágenes (de ahí el nombre *hipérico*, del prefijo *hiper*, que en griego quiere decir «encima de» y la terminación *eikon*, de la palabra griega icono, imagen), en la creencia de que los poderes místicos de la planta los protegerían de los espíritus diabólicos (1). El nombre vulgar de «hierba de San Juan» se relaciona con el hecho de que la floración suele tener lugar hacia finales de junio, en torno al solsticio de verano. Según una antigua leyenda europea, heredera del uso tradicional mencionado por Plinio, el día de San Juan había que colgar ramas de hipérico en todas las puertas de casas y establos para protegerlos de los demonios y sus hechizos, así como de las

enfermedades y toda clase de males a las personas y sus ganados. En el siglo XIII, el hipérico es mencionado en la relación de plantas medicinales de la Escuela Médica de Salerno como *Herba demonis fuga* («la hierba que pone en fuga al diablo») y todavía a comienzos del siglo XVII los monjes franciscanos la usaban como *Fuga Daemonum* (2).

Aparte de estos usos «mágicos», el hipérico se ha empleado tradicionalmente, tanto en uso externo como interno, con muy diversas aplicaciones terapéuticas, incluidos su uso como promotor del sellado de heridas y diurético, así como en el tratamiento de condiciones neurálgicas, ciática y de mordeduras de reptiles venenosos. El empleo de sus flores para estos usos ya fue documentado por los antiguos médicos griegos Hipócrates (460-377 a.C.), Teofrasto (372-287 a.C.), Dioscórides (primer siglo de nuestra era) y Galeno (131-201). En su monumental «Plantas medicinales. El Dioscórides renovado», Font Quer comenta que «*las virtudes atribuidas al hipérico son innumerables*». Entre ellas, destaca que «*goza la primera preferencia entre las plantas vulnerarias, por cuya razón su principal uso es para mundificar y consolidar las heridas y ulceraciones, sean internas o externas, y por esto la llaman hierba militar*» (3). Andrés de Laguna, en sus comentarios, dice que «*el hipérico es planta muy conocida por toda España, a do suelen llamarla comúnmente corazoncillo, porque hace las hojas a manera de corazones pequeños. Llámase también perforata por las boticas a causa que sus hojas tienen infinitos agujeritos por los cuales se translucen, como las telarañas*» (4). Font Quer señala que «*precisamente el empleo del hipérico como vulnerario parece que, por lo menos, se acrecentó en los albores del Renacimiento, cuando privaba la teoría de los signos, y hay quien lo atribuye a las señales de sus hojas, “perforadas” y, sin embargo, perfectamente “cicatrizadas”*» (3). En la «Cartilla Rústica» de Diego de Torres (5), aparece una fórmula para preparación del aceite de esta planta. En 1525, el médico suizo Paracelso establece su uso para el tratamiento de la depresión, la melancolía y la sobreexcitabilidad. Desde entonces ha sido usado en la medicina europea (sobre todo, centro-europea) tradicional para tratar neuralgias, ansiedad, neurosis y depresión. Además de su empleo en desórdenes psiquiátricos, en los últimos dos siglos se ha venido usando externamente para tratar heridas, magulladuras y esguinces, e internamente para combatir in-

fecciones víricas y bacterianas, úlceras pépticas, y enfermedades inflamatorias y de las vías respiratorias (2, 6-8).

El cada vez más popular uso en Alemania del hipérico para combatir la fatiga, el malestar y la depresión ha conducido a su estudio clínico empleando métodos científicos y objetivos desde finales de los años setenta del pasado siglo (2). Para el tratamiento de la depresión suelen emplearse extractos alcohólicos estandarizados (60% etanol o bien 80% metanol), preparados a partir de las partes aéreas de la planta secadas inmediatamente después de su recolección (en Europa, durante el período de florecimiento o justo antes del mismo) y se formulan en pastillas, cápsulas y jarabes para su administración oral (7). Los múltiples ensayos clínicos ya efectuados con diversos extractos llevan a la conclusión de que el hipérico, no siendo muy útil para el tratamiento de la depresión severa, es —en cambio— eficaz en el tratamiento de la depresión leve y moderada (2, 6-8).

En 1984, la Comisión E alemana aprobó el uso del hipérico para el tratamiento de estados de ánimo depresivos, perturbaciones psicovegetativas, estados de ansiedad e inquietud nerviosa. Desde entonces, otros varios países han aprobado la venta de preparados del hipérico como «suplemento dietético» y reconocen que el hipérico es un antidepresivo efectivo en el tratamiento de la depresión leve y moderada (2, 6). Por primera vez, en 1999 se introdujo una monografía sobre el hipérico en la *European Pharmacopoeia* (9). Como en Europa, también en Estados Unidos los preparados de hipérico, como la mayoría de las hierbas, se venden libremente con mínima regulación por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA), de acuerdo con el Acta de Salud y Educación sobre Suplementos Dietéticos de 1994. Desde entonces, su uso se ha incrementado exponencialmente. En Estados Unidos, las ventas anuales pasaron de 20 millones de dólares en 1995 a 200 millones de dólares en 1997 y más de 400 millones de dólares en 1998 (6). En Europa, en 1999 las ventas superaron los 6.000 millones de dólares. En Alemania, su principal mercado, el hipérico se prescribe unas 20 veces más que la fluoxetina, siendo uno de los antidepresivos más populares (8).

## **EMPLEO DE EXTRACTOS DE HIPÉRICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN LEVE A MODERADA**

Los extractos alcohólicos empleados como antidepresivos pueden contener un 0,1-0,3% de hipericina, un 2-4% de flavonoides y hasta un 6% de hiperforina (10). El número de extractos disponibles en el mercado es creciente. Independientemente de los extractos usados para ensayos clínicos, diversos análisis y metaanálisis coinciden en unas conclusiones que dejan poco lugar para la duda: el hipérico es superior al placebo y tan efectivo como algunos de los antidepresivos tricíclicos (imipramina) e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (fluoxetina) más representativos, en el tratamiento de la depresión leve y moderada (2, 7). Además, hay datos que apuntan a que el hipérico puede evitar la ansiedad asociada a la depresión más eficazmente que la imipramina (11). Los datos disponibles procedentes de todos los estudios clínicos muestran que el hipérico es bien tolerado y remarcablemente seguro, sin efectos adversos serios y con escasa incidencia de efectos secundarios leves (7). Estos datos son muy diferentes y mejores que los obtenidos con la mayoría de los otros antidepresivos.

Las interacciones del hipérico con otros fármacos descritas hasta la actualidad no son muy numerosas; se han documentado bien las interacciones con ciclosporina, anticonceptivos orales y otros antidepresivos, entre otros. Estos simples datos deberían bastar para que el hipérico dejara de ser considerado como un simple suplemento saludable de la dieta. Los pacientes, muy particularmente en Alemania, tienden a aceptar mejor los tratamientos con hierbas medicinales que con «drogas químicas» en la creencia de que «natural» es equivalente a «inocuo». Esto no es así y la fitoterapia debería ser una parte regular más de la medicina convencional, sometida a criterios equivalentes de regulación y estandarización. Este hecho es muy importante, ya que la actual falta de regulación y estandarización de las preparaciones de hipérico disponibles comercialmente continúa siendo una importante barrera para recomendar más extensamente su uso a los pacientes depresivos (2, 6).

Los aspectos económicos no deberían ser tampoco olvidados. Se estima que el coste diario de un tratamiento con hipérico es un 50% menor que el de un tratamiento con antidepresivos tradicionales y

hasta tres veces menor que el de un tratamiento con antidepresivos de última generación (2). Esto supone, desde un punto de vista farmacoeconómico, un ahorro muy considerable para muchos países.

## COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL HIPÉRICO

El hipérico contiene al menos diez clases de compuestos detectables biológicamente activos, resumidos en la Tabla 1. Estos compuestos varían en concentración incluso entre ejemplares distintos de plantas. Varias razones explican esta alta variabilidad: variaciones genéticas intraespecíficas, condiciones del entorno ecológico donde crecen, momento de recolección, preparación y procesamiento del material y exposición a la luz. A pesar de ello, los compuestos bioactivos representan aproximadamente el 20% de un extracto de la planta, según se ha verificado usando técnicas bioanalíticas estándares (8).

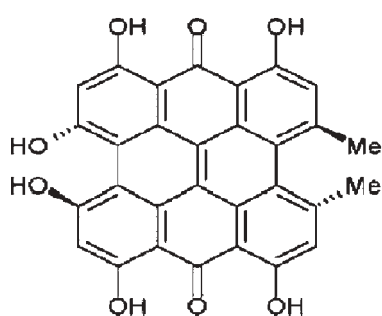
A continuación se describirán algunas de las más destacadas características de dos de los principales componentes bioactivos aislados de los extractos de hipérico, los más propiamente característicos de esta planta: la hipericina (una naftodiantrona) y la hiperforina (un derivado de floroglucinol) (ver fórmulas en Figura 2).

### Hipericina

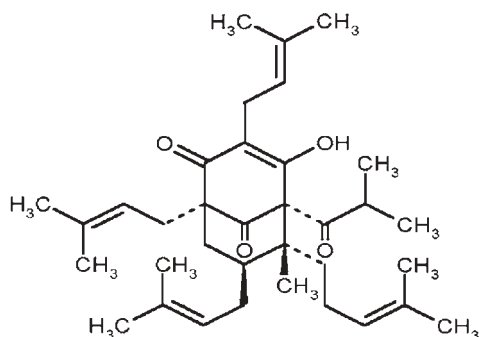
Muchos datos indican que la hipericina no presenta un papel importante en el efecto antidepresivo del hipérico (7, 8). No obstante, un estudio relativamente reciente parece haber demostrado que la hipericina presenta una significativa afinidad hacia los receptores  $\sigma$ -opioides (12).

La hipericina es probablemente el más potente fotosensibilizador natural conocido. Se entiende como *fotosensibilizador* un compuesto que, en presencia de oxígeno y mediante estimulación lumínica, genera radicales superóxido (reacción de tipo I), que —a su vez— puede formar radicales peróxido e hidroxilo, así como moléculas de oxígeno singlete,  $^1\text{O}_2$  (reacción tipo II). La *terapia fotodinámica* antitumoral consiste en la administración sistémica de un fotosensibilizador y la irradiación dirigida de luz visible focalizada en la lesión

tumoral. La generación local de especies reactivas de oxígeno por las reacciones de fotosensibilización de tipo I y/o II daña las células tumorales. Además de la muerte directa de las células tumorales, la terapia fotodinámica produce profundos cambios en la vasculatura tumoral y puede producir una respuesta inflamatoria. Probablemente, todos estos efectos cooperan sinérgicamente en la erradicación del tumor. Dados su carácter fuertemente fotosensibilizador y su escasa toxicidad en oscuridad, la hipericina es un compuesto de elección para la fototerapia dinámica: La fotosensibilización de células en presencia de hipericina desencadena la respuesta de diversas rutas de bioseñalización, que conducen a distintas respuestas celulares (supervivencia, apoptosis o necrosis) en función del nivel de estrés oxidativo producido, que —a su vez— depende de la dosis de irradiación y de la concentración de hipericina utilizadas (13).



## HIPERICINA



## HIPERFORINA

FIGURA 2. Estructuras químicas de la hipericina y la hiperforina.

Sin embargo, parece que diversos efectos de la hipericina se producen en la oscuridad, bajo condiciones en las que el compuesto no se ha fotoactivado. Entre estos efectos biológicos independientes de fotoactivación se incluyen la inhibición catalítica de la actividad DNA topoisomerasa II humana, así como actividades antivirales y antitumorales (14-17).

TABLA 1. *Compuestos biológicamente activos detectables en el hipérico. Adaptado de Greeson et al., 2001 (8). \*Código de una letra de aminoácidos proteinogénicos: C, cisteína; D, glutamato; K, lisina; L, leucina; P, prolina; T, treonina; N.D., no determinado*

Clase bioquímica	% en planta fresca	Compuesto activo	% en planta fresca
Naftodiantronas	0,3-3,0	Hipericina	0,09
		Pseudohipericina	0,23
Floroglucinoses	2-5	Hiperforina	2,0-4,5
		Adhiperforina	0,2-1,8
Flavonoides	12 (hojas), 7 (tallos), 2-4 (yemas)	Quercetina	2,0
		Hiperósido	0,7
		Quercitrina	0,5
		Isoquercitrina	0,3
		Rutina	0,3
		Amentoflavona	0,01-0,05
Procianidinas	12 (partes aéreas), 8 (flores y yemas)	Biapigenina	0,10-0,50
		Procianidina	N.D.
		Catequina	N.D.
		Epicatequina (polímero)	N.D.
Taninos	6-15	Ácido tánico	N.D.
Aceites esenciales	0,06-1,00	Terpenos, alcoholes	
Aminoácidos	0,01	GABA, ornitina, C, D, K, L, P, T*	
Fenilpropanos	0,1	Ácidos cafeico y clorogénico	
Xantonas	<0,01	Noratiriol, quielcorina	
Otros (hidrosolubles)	0,5	Ácidos orgánicos, péptidos, sacáridos	

## Hiperforina

La hiperforina parece ser uno de los principales compuestos causantes de los efectos antidepresivos del hipérico. Además, es un

compuesto excepcional, pues es el único antidepresivo que exhibe un efecto inhibitor de amplio espectro en la recaptación de neurotransmisores, inhibiendo con similar potencia los procesos de recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina. Es más, a diferencia de otros fármacos antidepresivos, también inhibe la recaptación de los aminoácidos neurotransmisores GABA y glutamato. Estos efectos conducen a una elevación en los niveles extraneuronales de los neurotransmisores mencionados (6). Como la fuerza conductora de todos los transportadores de estos neurotransmisores es el gradiente de iones sodio (18), estos efectos de amplio espectro podrían conseguirse aumentando la concentración intracelular de iones sodio. En efecto, la hiperforina aumenta los niveles intracelulares de iones sodio libres, un efecto que puede deberse bien a una activación de la proteína intercambiadora de iones sodio y protones presente en las membranas plasmáticas de las neuronas (lo cual produciría un aumento del transporte de sodio hacia el interior de la neurona) y/o a un bloqueo de los canales de sodio sensibles a amiloride (lo cual reduciría la expulsión de iones sodio del interior de la neurona). Además, la hiperforina también inhibe las respuestas mediadas por receptores GABA, NMDA y AMPA y promueve la apertura de canales de calcio presinápticos, estimulando así la liberación de neurotransmisores desde los sinaptosomas al espacio intersináptico (6, 19, 20). Todos estos datos parecen indicar que la actividad antidepresiva de la hiperforina es debida a un mecanismo de acción novedoso, independiente de interacciones específicas con las propias proteínas transportadoras implicadas en la recaptación de neurotransmisores (20, 21). Más bien, el nuevo mecanismo de acción representado por los efectos de la hiperforina sería la consecuencia de sus efectos sobre la homeostasis iónica en el sinaptosoma. Además, también se ha demostrado que la hiperforina aumenta los valores de pH citosólico y modifica diferentes parámetros de los que depende la fluidez de las membranas neuronales (20, 22, 23); estas modificaciones, a su vez, pueden producir efectos sobre distintos mecanismos de conductividad iónica, que podrían también contribuir a sus propiedades farmacológicas (23-27). Aunque con lo dicho parece quedar claro que la hiperforina es una de las principales causantes de los efectos antidepresivos del hipérico a través de los movimientos iónicos que promueve y las consecuencias de los mismos, otros compuestos y otras acciones también podrían contribuir a la eficien-



cia clínica del hipérico. Aparte de la hiperforina, recientemente se ha comprobado que otros dos tipos de compuestos, la adhiperforina y las procianidinas, presentan un perfil de amplio espectro inhibitorio de la recaptación de neurotransmisores.

Por otra parte, en los últimos años se ha avanzado mucho en la caracterización de otras actividades de la hiperforina con potencial interés farmacológico y biomédico. Su espectro de acción incluye efectos neurológicos, antibacterianos, antitumorales y moduladores de la inflamación, tal como recoge una reciente revisión sistemática sobre el tema elaborada por nuestro grupo (28). Cabe destacar que los efectos antitumorales de la hiperforina descritos hasta la fecha son múltiples, e incluyen efectos anticarcinogénicos, antiproliferativos, proapoptóticos, antiinvasivos y antimetastáticos.

### **LA HIPERICINA Y LA HIPERFORINA COMO DOS NUEVOS COMPUESTOS ANTIANGIOGÉNICOS**

A pesar de que varios de los usos del hipérico en la farmacopea tradicional están relacionados con procesos dependientes de angiogénesis, hasta fechas muy recientes no había ningún estudio publicado que analizara sistemáticamente los potenciales efectos de hipericina e hiperforina sobre la angiogénesis. Tal tarea era abordable por nuestro grupo, dado que desde hace doce años disponemos de la experiencia para analizar la capacidad moduladora del balance proteolítico en la matriz extracelular, uno de los pasos claves de la angiogénesis (29-31) y desde hace seis años disponemos de una amplia batería de ensayos *in vivo* e *in vitro* para la caracterización de los efectos de nuevos moduladores de angiogénesis (32-34).

Nuestros resultados recientemente publicados identifican inambiguamente la hiperforina y la hipericina (no fotoactivada) como dos nuevos compuestos naturales antiangiogénicos, caracterizan los efectos específicos de cada uno sobre los distintos pasos claves de la angiogénesis y amplían el espectro de acción farmacológica del hipérico como planta medicinal. La prioridad de estos hallazgos nos corresponde, ya que estos resultados dieron lugar a dos artículos de investigación original publicados en 2005, que fueron la primera caracterización sistemática de los efectos antiangiogénicos de hiperfo-

rina e hipericina (en oscuridad), respectivamente (35, 36). Así, nosotros hemos demostrado por primera vez que la hipericina no fotoactivada es capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales, la formación de estructuras tubulares sobre Matrigel, su capacidad migratoria e invasiva y su producción de la serín-proteasa uroquinasa (36). Prácticamente al mismo tiempo que nuestro trabajo, se aceptó para su publicación un trabajo independiente de otro grupo de investigación que, con modelos y aproximaciones experimentales distintos también demuestran que la hipericina tiene efectos antiangiogénicos con potenciales aplicaciones para el tratamiento de enfermedades oftálmicas dependientes de angiogénesis (37). Por otra parte, también hemos sido los primeros en demostrar que la hiperforina inhibe la angiogénesis *in vivo* y que es capaz de inhibir diversos pasos claves del proceso angiogénico, incluyendo la proliferación, diferenciación y capacidad invasiva de las células endoteliales, así como su capacidad de degradar matrices extracelulares mediante la liberación de MMP-2 (metaloproteinasa de matriz extracelular 2) y uroquinasa (35). Posteriormente, en un trabajo acerca del efecto inhibitorio de la hiperforina sobre la secreción de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz extracelular 9) por células leucémicas (38), los autores se atreven a reclamar que ellos son los primeros en comprobar el efecto inhibitorio de la hiperforina sobre tres pasos claves de la angiogénesis, sin hacer mención a nuestro trabajo previo, a pesar de encontrarse disponible desde medio año antes de la fecha de aceptación de su estudio. Un tercer grupo independiente también ha publicado posteriormente a nosotros otro trabajo que confirma que la hiperforina actúa como un inhibidor de angiogénesis (39).

La Figura 3 resume los diversos efectos inhibidores de estos dos compuestos bioactivos del hipérico sobre pasos claves del proceso angiogénico.

Dado que las enfermedades neoplásicas dependen de la angiogénesis para su progresión y metástasis y puesto que se ha descrito gran cantidad y diversidad de otras patologías dependientes de angiogénesis, nuestros trabajos abren vías al potencial uso farmacológico de estos compuestos en el tratamiento de dichas enfermedades. Caben esperar más sorpresas del estudio científico de sus compuestos bioactivos en el futuro cercano.

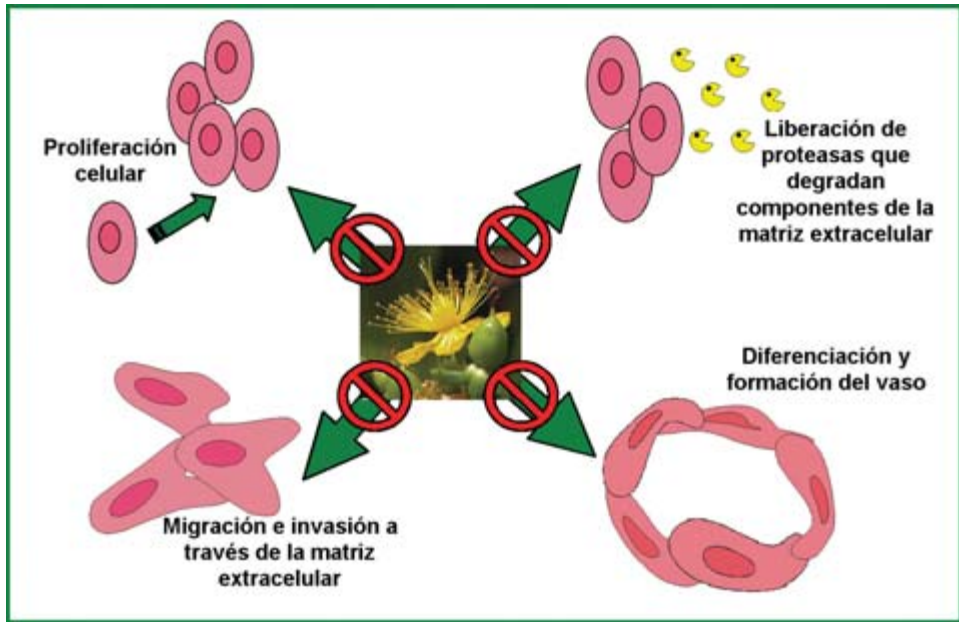


FIGURA 3. *Efectos inhibidores de los compuestos hipericina e hiperforina, característicos del hipérico, sobre pasos claves del proceso angiogénico.*

### AGRADECIMIENTOS

Nuestro trabajo experimental se financia con fondos de los proyectos CTQ2006-15279-C03-03/BQU, SAF2005-01812 y PTR95-0904 (MEC) y del grupo consolidado de investigación CVI-267 (Junta de Andalucía).

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) MILLER, L. G. (1998): Herbal medicine. Selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch. Intern. Med.* 158: 2200-2211.
- (2) GUPTA, R. K. and MOLLER, H. J. (2003): St. John's Wort. An option for the primary care treatment of depressive patients? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 253: 140-148.
- (3) FONT-QUER, P. (1961): Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Península, Madrid.

- (4) LAGUNA, A. (1570): Pedacio Dioscórides Anazarbeo, acerca de la materia medicinal y de los venenos mortíferos. Salamanca.
- (5) TORRES, D. (1727): Cartilla rústica, physica visible y astrología innegable: lecciones de agricultura y juicios pastoriles para hacer docto al rústico. Madrid.
- (6) BILIA, A. R.; GALLORI, S. and VINCIERI, F. F. (2002): St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sci.* 70: 3077-3096.
- (7) DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST E. and IZZO, A. A. (2001): St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 292-297.
- (8) GREESON, J. M.; SANFORD B. and MONTI, D. A. (2001): St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacol.* 153: 402-414.
- (9) MULTIPLES AUTORES (2000): European Pharmacopoeia, 3.<sup>a</sup> ed., Supp. 2001, S972. Council of Europe. Strasbourg, Francia.
- (10) VITIELLO, B. (1999): *Hypericum perforatum* extracts as potential antidepressants. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 513-517.
- (11) WOELK, H. (2000): Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *BMJ* 321: 536-539.
- (12) RAFFA, R. B. (1998): Screen of receptor and uptake site activity of hypericin component of St. John's wort reveals sigma receptor bonding. *Life Sci.* 62: 265-270.
- (13) AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W. and DE WITTE, P. A. M. (2002): Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 221-241.
- (14) PEEBLES, K. A.; BAKER, R. K.; KURZ, E. U.; SCHNEIDER, B. J. and KROLL, D. J. (2001): Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase IIa by hypericin, a naphthodianthrone from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biochem. Pharmacol.* 62: 1059-1070.
- (15) MERUELO, D.; LAVIE, G. and LAVIE, D. (1988): Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5230-5234.
- (16) TANG, J.; COLACINO, J. M.; LARSEN, S. H. and SPITZER, W. (1990): Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antivir. Res.* 13: 313-326.
- (17) BLANK, M.; MANDEL, M.; HAZAN, S.; KEISARI, Y. and LAVIE, G. (2001): Anti-cancer activities of hypericin in the dark. *Photochem. Photobiol.* 74: 120-125.
- (18) MALANDRO, M. S. and KILBERG, M. S. (1996): Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 605-636.
- (19) CHATTERJEE, S. S.; BIBER, A. and WEIBEZAHN, C. (2001): Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 34: S11-S19.
- (20) MULLER, W. E.; SINGER, A. and WONNEMANN, M. (2001): Hyperforin-antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* 34: S98-S102.

- (21) SINGER, A.; WONNEMANN, M. and MULLER, W. E. (1999): Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular  $\text{Na}^+$ . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1363-1368.
- (22) KRISHTAL, O.; LOZOVAYA, N.; FISUNOV, A.; TSINTSADZE, T.; PANKRATOV, Y.; KOPANITSA, M. and CHATTERJEE, S. S. (2001): Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry* 34: S74-S82.
- (23) ECKERT, G. P.; KELLER, J. H.; JOURDAN, C.; KARAS, M.; VOLMER, D. A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. and MULLER, W. E. (2004): Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci. Lett.* 367: 139-143.
- (24) MARSH, W. L. and DAVIES, J. A. (2002): The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin. *Life Sci.* 71: 2645-2655.
- (25) ROZ, N. and REHAVI, M. (2003): Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sci.* 73: 461-470.
- (26) ROZ, N. and REHAVI, M. (2004): Hyperforin depletes synaptic vesicles content and induces compartmental redistribution of nerve ending monoamines. *Life Sci.* 75: 2841-2850.
- (27) KIEWERT, C.; BUCHHOLZER, M. L.; HARTMANN, J.; CHATTERJEE, S. S. and KLEIN, J. (2004): Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *Neurosci. Lett.* 364: 195-198.
- (28) MEDINA M. A.; MARTÍNEZ-POVEDA, B.; AMORES-SÁNCHEZ, M. I. and QUESADA, A. R. (2006): Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci.* 79: 105-111.
- (29) GARCÍA DE VEAS, R.; SCHWEIGERER, L. and MEDINA, M. A. (1995): Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in paediatric tumour cells. Effects of tumour cell proliferation modulators on gelatinolytic activity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121: 275-278.
- (30) GARCÍA DE VEAS, R.; SCHWEIGERER, L. and MEDINA, M. A. (1998): Modulation of the proteolytic balance plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor by enhanced N-myc oncogene expression or application of genistein. *Eur. J. Cancer* 34: 1736-1740.
- (31) FAJARDO, I.; QUESADA, A. R.; NÚÑEZ DE CASTRO, I.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. and MEDINA, M. A. (1999): A comparative study of the effects of genistein and 2-methoxyestradiol on the proteolytic balance and tumour cell proliferation. *Br. J. Cancer* 80: 17-24.
- (32) RODRÍGUEZ-NIETO, S.; GONZÁLEZ-IRIARTE, M.; CARMONA, R.; MUÑOZ-CHÁPULI, R.; MEDINA, M. A. and QUESADA, A. R. (2001): Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.* 10.1096/fj.01-0427fje.
- (33) CASTRO, M. A.; GONZÁLEZ-IRIARTE, M.; BARRERO, A. F.; SALVADOR-TORMO, N.; MUÑOZ-CHÁPULI, R.; MEDINA, M. A. and QUESADA, A. R. (2004): Study of puerpene and related compounds as inhibitors of angiogenesis. *Int. J. Cancer* 110: 31-38.

- (34) CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R. and MEDINA, M. A. (2004): Effects of ursolic acid on diferent steps of the angiogenic process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 402-408.
- (35) MARTÍNEZ-POVEDA, B.; QUESADA, A. R. and MEDINA, M. A. (2005): Hyperforin, a bio-active compound of St. John's wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int. J. Cancer* 117: 775-780.
- (36) MARTÍNEZ-POVEDA, B.; QUESADA, A. R. and MEDINA, M. A. (2005): Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 516: 97-103.
- (37) LAVIE, G.; MANDEL, M.; HAZAN, S.; BARLIYA, T.; BLANK, M.; GRUNBAUM, A.; MERUELO, D. and SOLOMON, A. (2005): Anti-angiogenic activities of hypericin in vivo: Potential for ophthalmologic applications. *Angiogenesis* 8: 35-42.
- (38) QUINEY, C.; BILLARD, C.; MIRSHANI, P.; FOURNERON, J. D. and KOLB, J. P. (2006): Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia* 20: 583-589.
- (39) SCHEMPP, C. M.; KISS, J.; KIRKIN, V.; AVERBECK, M.; SIMON-HAARHAUS, B.; KREMER, B.; TERMEER, C. C.; SLEEMAN, J. and SIMON, J. C. (2005): Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Med.* 71: 999-1004.

————— *Mesa Redonda* —————

## **Homenaje a Ramón y Cajal en el centenario de la concesión del Premio Nobel**

Mesa redonda celebrada en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 23 de noviembre de 2006

Coordinadora:

Excma. Sra. Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.  
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

Excmo. Sr. Don Jesús Ávila de Grado.  
Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas,  
Físicas y Naturales: *«La visión de futuro de Cajal»*

Doña Ángela Nieto. Profesora de Investigación del CSIC:  
*«De cómo los embriones ayudaron a Cajal y nos ayudan hoy a entender la salud y la enfermedad»*

En octubre de 1906 la Academia de Ciencias Sueca comunicó telegráficamente a Don Santiago Ramón y Cajal la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina, leyendo su discurso el 12 de diciembre de 1906 ante la Academia de Ciencias en Estocolmo. El texto disponible en versión electrónica en la Fundación Nobel sigue siendo, a pesar del tiempo transcurrido, una pieza maestra de claridad y conocimiento profundo del sistema nervioso. Selecciona en su presenta-

ción los aspectos, a su juicio, más relevantes de su labor científica, muchos de los cuales de modo más amplio habían sido previamente publicados en el excepcional tratado titulado «*TEXTURA DEL SISTEMA NERVIOSO DEL HOMBRE Y DE LOS VERTEBRADOS*». La primera edición, costeada por el propio Cajal, se editó en cuadernillos de modo muy modesto en 1904 y con una tirada muy corta. Cinco años más tarde, en 1909, es la Editorial Maloine de París, siendo ya Cajal Premio Nobel, la que editaría la segunda edición del tratado «*HISTOLOGIE DU SYSTÈME NERVEUX DE L'HOMME ET DES VERTEBRÉS*». Edición que ha servido de vehículo difusor de su trabajo y que por miopía de las instituciones ministeriales de la época los propios españoles tenían que consultar en francés hasta que en 1992 se hace una reedición del primer tratado en castellano y gracias al esfuerzo y empeño de dos grandes neurocientíficos, los doctores Carlos Belmonte, del Instituto de Neurociencias de Alicante, y Jaime Merchán, coordinador de la edición. Esto trae a mi memoria que después de la concesión del Premio Nobel a Cajal se creó un edificio grande y muy costoso para él y su grupo de investigación en el Recinto del Jardín del Retiro de Madrid. Centro cuya ocupación y utilidad para la investigación fue nula, pero no hubo dinero para editar sus obras. Pienso, y la historia me da la razón, que los libros excepcionales perduran más que los edificios, recordemos a Homero con los libros clásicos de la Iliada y la Odisea, que siguen vivos, mientras que de los edificios de la época queda poca cosa en Troya.

Todos los biógrafos de Ramón y Cajal destacan su naturaleza rebelde e inconformista, tanto fuera como dentro de las aulas, en sus primeros años escolares, e incluso como él mismo comenta en sus años de presencia en las aulas de la facultad de Medicina: «*Sólo dos cualidades había en mí anteriormente, quizá algo más desarrolladas que en mis condiscípulos, cualidades que acaso hubieran atraído la atención de los profesores, si mi nada envidiable reputación de alumno perezoso y descuidado no me hubieran condenado de antemano a la indiferencia de todos. Eran éstas una petulante independencia de juicio que me arrastró alguna vez hasta la discusión de las opiniones científicas de un querido sabio y dignísimo maestro, con escándalo bien justificado de mis condiscípulos, y un sentimiento profundo de nuestra decadencia científica...*» (Prólogo de la segunda edición de «Reglas y consejos sobre investigación científica»). Es



posible que en la universidad actual, sin expediente adecuado, y su fama de litigante, nunca hubiera obtenido una beca ni hubiese sido aceptado en un laboratorio con medios suficientes. Tampoco habría podido instalar el microscopio Zeiss que compró con sus ahorros como médico del ejército en Cuba, en otro lugar que la cocina de su casa. Pero me concedo el beneficio de la duda, ya que en universidades jóvenes de reciente creación, necesitadas de personal docente y con laboratorios hay huecos para gente más «iconoclasta» y no sometida totalmente a las leyes de los números para ejercer su pasión. ¿Será de esos reductos de libertad de donde surjan nuestras futuras mentes con ideas originales?

Me voy a permitir una visión y análisis diferente de la tan traída y llevada historia de Cajal. Nace en el seno de una familia de clase media, modesta, pero instruida, donde se valoraba el estudio y los bienes «incluidos los materiales» que de él se derivan. Su padre y seguro que su madre, no eran precisamente tolerantes con la falta de aplicación de su hijo, y lo hacen pasar por experiencias laborales manuales, que le hacen ver los valores añadidos del estudio y el trabajo intelectual. Sin el control familiar el espíritu libre de Cajal podría haber derivado en cualquier otra trayectoria vital, seguramente no tan loable. Ser médico no era una mala opción a mediados del siglo XIX y Cajal lo supo comprender muy bien, eso sí, haciendo gala de lo que da su tierra de origen, sin perder un ápice de su carácter de aragonés indomable.

Sus dotes para el dibujo eran innatas, aspectos que hoy día están olvidados en los inmensos programas de estudio de nuestros escolares, la mayoría carecen de esa cualidad, pero los que la tengan no deben de ser descuidados, y él las ejercitó. Era un artista capaz de extraer lo esencial de lo que veía e imaginar en tres dimensiones lo que eran las imágenes planas de las preparaciones para microscopio. Cómo pudo entrever los planos de las diferentes capas del cerebelo y sus células específicas, es todavía motivo de admiración. Cómo imaginar la necesidad de un cono de crecimiento para que los axones crecieran y pudieran conectar con otras neuronas fue otra de sus grandes intuiciones. Lo mismo que las grandes vías y caminos cerebrales, todas ellas formadas por elementos discontinuos de células neuronales que necesitarían comunicarse mediante señales químicas, la gran teoría neuronal.

Es fácil decir que Cajal fue un espejismo en el panorama científico español de la época, un fruto inesperado, cuajado y sabroso en medio del desierto, pero lo cierto es que cuando Cajal inicia sus estudios había muchas facultades de medicina en España y la justa economía familiar pudo permitirse el enviarlo a la de Zaragoza, que en aquella época no era supuestamente de las consideradas más prestigiosas. Quizá su profesorado era más joven y estaría esperando continuar su periplo en otras universidades supuestamente de «más nivel», como el propio Cajal hizo años más tarde, cuando vuelve de Cuba y lo contratan como profesor auxiliar de anatomía en Zaragoza (1875), donde compra su propio microscopio (1877) con sus ahorros, claro está que en esa época no estaba todavía casado y no necesitaba los ahorros para su familia. Sigue luego la ronda hacia Valencia, como catedrático en 1884, Barcelona en 1887, y al final Madrid en 1892. Hasta aquí Cajal sería un profesor más con el comportamiento genuino de los profesores de las universidades españolas hasta la Ley de Reforma Universitaria en la que se trata de potenciar los grupos de trabajo y la continuidad en las escuelas científicas, muchas de ellas excelentes. Desgraciadamente la ley trajo también el anclaje y consolidación de grupos de bajo perfil, auténticos tapones del conocimiento, que son inamovibles.

En la España del último cuarto del siglo XIX Cajal no estaba tan sólo y de echo uno de sus grandes encuentros fue con el gran histólogo español Maestre de San Juan, a quien visitó en Madrid en 1877, quedando tan entusiasmado que toma la decisión de comprarse su propio microscopio. No era tanto el desierto, algo había, y Maestre de San Juan debería de ser reconocido y admirado, fue un eslabón de la cadena del conocimiento absolutamente necesario. Otro encuentro de gran trascendencia tuvo lugar en 1887, cuando tenía treinta y cinco años y siendo catedrático en Valencia, a punto de trasladarse a Barcelona, se trata del neuropsiquiatra valenciano Luis Simarro, quien recién llegado de París, traía la nueva metodología de técnicas de tinción del sistema nervioso, la técnica del cromato de plata, la impregnación de plata o *reazione nera*, ideada por Camilo Golgi. Vemos aquí la importancia que tiene la actualización permanente de la metodología para poder seguir el diálogo universal de la ciencia y competir en igualdad con los grupos de otros países desarrollados, pero no todo es metodología y es necesario que exista una

idea original para ser desarrollada. Esta era la virtud de Cajal, quien inicia un trabajo frenético durante sus años en Barcelona, ideando modelos y compilando datos.

En 1889 realiza Cajal su primer viaje fuera de España, si exceptuamos la estancia en los territorios de ultramar, Cuba, el viaje a Berlín al congreso de la Sociedad Alemana de Anatomía. Este viaje supone su bautismo científico y el apoyo a su teoría neuronal por parte de uno de los más eminentes histólogos de la época, Rudolf Albert von Kölliker. Cuando llega a la cátedra de Madrid en 1892, las grandes ideas ya habían sido gestadas y desarrolladas en gran medida. Años más tarde, cuando insta a los más jóvenes a dedicar tiempo y aplicar la voluntad a los problemas que apasionan el espíritu del conocimiento, seguramente que echaba en falta su propio sosiego y el tiempo de dedicación necesario. Otro de nuestros clásicos, Baltasar Gracián, lo definió diciendo: «*Hay ocupaciones que son polillas del tiempo precioso*» y ser Premio Nobel tenía contraprestaciones que llevaban a interminables pérdidas de tiempo.

Nada dentro del sistema nervioso e incluso otros tejidos escaparon a la curiosidad sistemática de Cajal, su capacidad de comprender lo más grande, de interpretar sus preparaciones en términos de unidades discontinuas, lo neuronal frente a lo glial, la polarización dinámica de las propias neuronas para su funcionamiento, y las reacciones a las lesiones de nervios y tejidos neuronales entraron dentro de su capacidad de estudio y análisis. Creó una gran escuela de la que son deudores todos los neurocientíficos del mundo; por desgracia nuestro país no pudo obtener todos los beneficios deseados y por esas tragedias demasiado frecuentes en el solar de Iberia, se desmembró su escuela y se centrifugó y exilió al mejor grupo y escuela científica que jamás existió en nuestro país.

En 1959, cincuenta y tres años más tarde, Severo Ochoa, formado en el espíritu de aquella facultad de Medicina de finales de los años veinte y comienzos de la década de los años treinta del siglo XX, recibía el Premio Nobel en Fisiología y Medicina, pero esta vez entregado a los Estados Unidos. Faltan tres años para cumplir otros cincuenta y tres años y uno se pregunta si el periodo de frecuencia entre las ondas será el mismo, o si todavía será más dilatado. Tenemos buenas instalaciones en los centros del Consejo Superior de Investigaciones Cien-

tíficas, tenemos grandes grupos, tenemos magníficas individualidades, tenemos en contrapartida una situación deplorable en alguna de las universidades históricas, tenemos a nuestros jóvenes en sus años más creativos demasiado encorsetados. Tenemos a los profesores rodeados de burocracia asfixiante a todas horas y no olvidemos que son ellos, que somos, el eslabón que debería de sembrar la ilusión y difundir el conocimiento certero y actual. No sé cuando vendrá ese nuevo Premio Nobel, tenemos investigadores que se lo merecen, y es de esperar que no tarde mucho más. La desdichada frase de Don Miguel de Unamuno sacada de contexto de «*¡Qué inventen ellos!*» tiene que ser definitivamente borrada. Necesitamos creer en nosotros mismos y cuando se vislumbra la llama de la voluntad y creatividad en algún joven ayudar en lo posible para que crezca. Necesitamos generosidad y grandeza para reconocer lo que vale y escuchar y fomentar la iniciativa de los que ponen voluntad y empeño. Necesitamos responder a la cuestión que plantea Cajal en sus memorias: «*¿Cómo se crea la vocación irresistible hacia la Ciencia?*»

Esta mesa redonda en homenaje al centenario de la concesión del Premio Nobel a Don Santiago Felipe Ramón y Cajal, sirve para constatar el excelente momento que vive la neurociencia en España, con desarrollo notable de todas sus facetas y supone un honor para mí el poder presentar ante esta corporación a dos científicos de renombre que han realizado contribuciones pioneras en sus respectivos campos: El Doctor Jesús Ávila, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, conocido por sus trabajos en neurodegeneración, y la Doctora Ángela Nieto, del Instituto de Neurociencias de Alicante, por sus contribuciones a comprender el desarrollo embrionario neural.

*Madrid, 23 de noviembre de 2006*  
*M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal*

## La visión de futuro de Cajal

JESÚS ÁVILA DE GRADO\*

*Académico de Número de la Real Academia de Ciencias  
Exactas, Físicas y Naturales.*

*Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»,  
CSIC-UAM, Madrid*

En este acto en la Real Academia Nacional de Farmacia, conmemoramos el centenario de la concesión del Premio Nobel a Don Santiago Ramón y Cajal, un científico de talla excepcional del nivel de Pasteur o Darwin. Ramón y Cajal es el padre de la Neurociencia, y uno de los pioneros de lo que hoy conocemos como Biología Celular. Muchos de sus trabajos y profecías han sido y siguen siendo motivo de inspiración para la realización de nuevos experimentos cuyos resultados coinciden con lo postulado por Ramón y Cajal. En este escrito daré algunos ejemplos.

La grandeza de Don Santiago no sólo se debe a sus descubrimientos, en los que describió con gran rigurosidad la estructura del sistema nervioso, sino, fundamentalmente, a que profetizó cómo era el funcionamiento de dichas estructuras. Es curioso ver en sus dibujos no sólo los esquemas de conexiones y circuitos, sino las flechas indicando direcciones de posibles transmisiones neuronales.

Posiblemente, el hallazgo de Ramón y Cajal con más resonancia es el relacionado con la teoría neuronal (1), pero no sólo indicó que la neurona era el componente básico del sistema nervioso, sino que describió su desarrollo, estudió su degeneración y discutió sobre su posible regeneración.

Actualmente se conoce cómo tienen lugar los cambios morfológicos que se producen en la célula precursora de la neurona, el

---

\* Dirección de contacto: Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa». Facultad de Ciencias. Campus de Cantoblanco. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 - Madrid (Spain). Telf.: 34 91 497 84 40. Fax: 34 91 497 47 99. e-mail: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es)

neuroblasto, para dar lugar a la neurona madura, con una morfología tal que le pueda permitir interactuar con otras neuronas para formar las redes neuronales que son la base del funcionamiento del sistema nervioso. Cajal (2, 3) describió cómo de la forma esférica del neuroblasto iban surgiendo diferentes proyecciones que iban a dar lugar al axón (que él llamó cilindro-eje), la más larga y fina de estas proyecciones; y las dendritas, que son el resto de dichas proyecciones (Fig. 1). En la actualidad conocemos que los elementos mayoritarios del armazón (citoesqueleto) neuronal son los microtúbulos, fibras que polimerizan y despolimerizan de un modo muy dinámico.

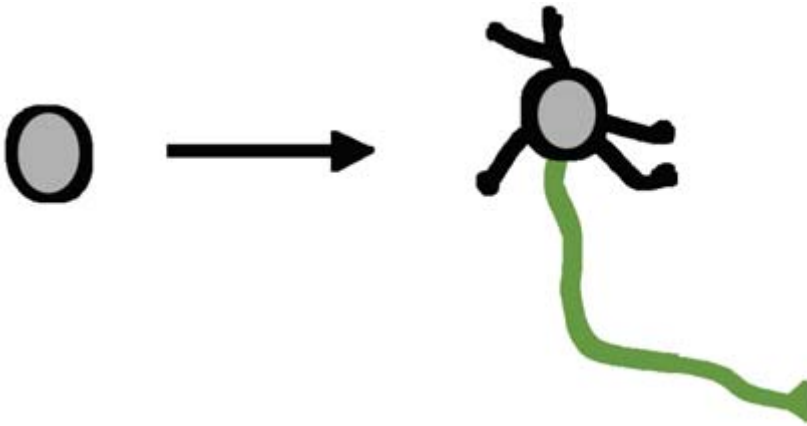


FIGURA 1. *A partir del neuroblasto, una célula esférica, se van extendiendo proyecciones que forman el axón (la de mayor longitud) y las dendritas de una neurona madura.*

Si la probabilidad de polimerización-despolimerización de estas estructuras es similar en cualquier dirección, la forma de la célula será esférica, como es la del neuroblasto. Pero, si debido a algún tipo de señal se produce una estabilización de dichas estructuras (los microtúbulos) en una dirección específica, en esa dirección los microtúbulos seguirán polimerizando, pero no despolimerizando, y, como consecuencia, se producirá una extensión del citoplasma en esa dirección, que dará lugar a las proyecciones descritas por Cajal. Es pues importante saber cuáles son los elementos que estabilizan a los microtúbulos, y ya se conocen muchos de ellos, entre los que desta-

can las proteínas asociadas a los microtúbulos. Cajal describió (4) que esta extensión se facilitaba por la presencia, en el exterior de la neurona, de factores tróficos. Por el descubrimiento de uno de estos factores, sugeridos por Cajal, le fue concedido el Premio Nobel a Doña Rita Levi-Montalcini y a Don Stephen Cohen en 1986.

Por otra parte, Don Santiago sugirió que las proyecciones de los neuroblastos se podían orientar, y cambiar de dirección, por estimulación química (quimiotropismo o neurotropismo) (5). Para estos cambios, Cajal sugirió la existencia de un sensor en el extremo distal del axón, al que llamó cono de crecimiento (6). Hoy conocemos la existencia de proteínas atrayentes o repulsoras para el axón y, es posible, que sus descubridores puedan recibir el Premio Nobel en el futuro.

Una vez desarrollado, el axón de una neurona puede contactar (generalmente con una dendrita), con otra neurona, en lo que Cajal describió como el ósculo protoplásmico, y que hoy conocemos como sinapsis (Fig. 2).

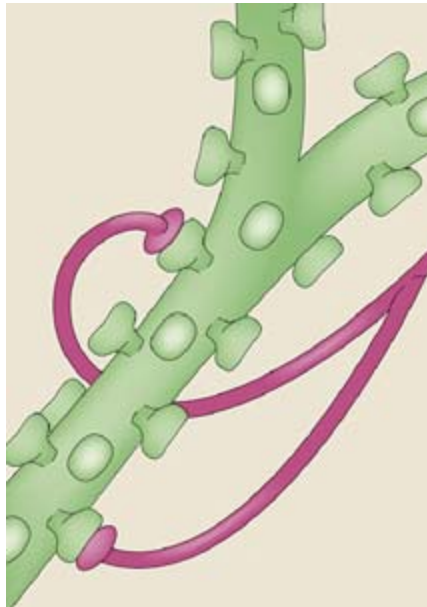


FIGURA 2. *La interacción axón-dendrita que Don Santiago calificó como ósculo protoplásmico.*

Adicionalmente, Cajal sugirió que los lugares de recepción en la dendrita eran, en muchas ocasiones, unas protuberancias que él denominó como espinas dendríticas (7), y sugirió que estas espinas dendríticas podrían estar implicadas en procesos de aprendizaje y memoria, una hipótesis que fue posteriormente sugerida por el también Premio Nobel, Francis Crick. Cajal también describió los circuitos neuronales que hoy conocemos están implicados en procesos de memoria (8).

Pero Cajal estudió no sólo la función sino la disfunción del sistema nervioso. Una de las preocupaciones de Don Santiago fue conocer cómo funcionaba correctamente el sistema nervioso para detectar posibles fallos que podrían conducir a la degeneración neuronal. Buscaba, en sus propias palabras, que el *órgano del alma funcionara correctamente*, y que cuando el sistema nervioso por motivos como, por ejemplo, la edad, dejara de funcionar, *los ancianos no quedarán atrapados por la demencia* (9). Sin embargo, llegó a la conclusión de que la regeneración de axones y dendritas era difícil una vez dañados (9), indicando que *«una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse. Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto»*.

Esta última frase de Ramón y Cajal indica su gran sabiduría pues, hoy conocemos que hay una zona del sistema nervioso central en la que los axones pueden crecer. Esta zona es la que conecta el epitelio olfatorio (zona periférica) con el bulbo olfatorio (sistema nervioso central), posibilitándose ese crecimiento axonal por la existencia, en esa zona, de un tipo especial de glía, la glía envolvente del bulbo olfatorio. De este modo se ha probado si la presencia de dicho tipo de glía en otras zonas del sistema nervioso que pudieran estar dañadas, como la médula espinal, podría facilitar el crecimiento axonal. Para ello se han realizado trasplantes de dicha glía a zonas dañadas, en modelo de rata lesionada y se ha visto recuperación funcional (10, 11).

Como corolario, se puede indicar que Don Santiago se anticipó a muchos de los descubrimientos en Neurociencias. Es de esperar que los científicos sigan pues leyendo con detalle las obras de Cajal como



fuente de inspiración para el planteamiento de futuros experimentos, y de esta manera poder ir conociendo las claves de la Neurociencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAMBURGUER, V. (1980): *Perspectives in Biology and Medicine*. 23: 600-616.
- (2) RAMÓN Y CAJAL, S. (1906): The structure and connexions of neurons. *Nobel lecture*.
- (3) RAMÓN Y CAJAL, S. (1894): *Consideraciones generales sobre la morfología de la célula nerviosa*. Imprenta Moya, Madrid.
- (4) RAMÓN Y CAJAL, S. (1894): Consideraciones sobre la morfología de la célula nerviosa. *La Veterinaria Española*. 37: 257-291.
- (5) RAMÓN Y CAJAL, S. (1894): The croonian Lecture: la fine structure des centres nerveux. *Proc. Royal Soc. London*. 55: 444-468.
- (6) RAMÓN Y CAJAL, S. (1972): *The structure of the retina*. Trans. Thorpe and Glink. Springfield Ill. Thomas p. 146.
- (7) RAMÓN Y CAJAL, S. (1890): A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épicière du poulet. *Anat. Anzerger*. 5: 609-613.
- (8) TESSIER-LAVIGNE, M. and GOODMAN, C. S. (1996): The molecular biology of axon guidance. *Science*. 274: 1123-1133.
- (9) RAMÓN Y CAJAL, S. (1888): Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Pato*: 1, 1-10.
- (10) RAMÓN Y CAJAL, S. (1899): *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Imprenta Moya, Madrid.
- (11) RAMÓN Y CAJAL, S. (1914): *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Imprenta Moya, Madrid.
- (12) RAMÓN-CUETO, A.; CORDERO, M. I.; SANTOS-BENITO, F. F. and ÁVILA, J. (2000): Functional recovery of paraplegia rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*. 25: 425-435.
- (13) MORENO-FLORES, M. T.; BRADBURY, E. J.; MARTÍN-BERMEJO, M. J.; AGUDO, M.; LIM, F.; PASTRANA, E.; ÁVILA, J.; DÍAZ-NIDO, J.; McMAHON, S. B. and WANDOSELL, F. (2006): A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Molecular Therapy*. 13: 598-608.



# **De cómo los embriones ayudaron a Cajal y nos ayudan hoy a entender la salud y la enfermedad**

M. ÁNGELA NIETO \*

*Instituto de Neurociencias de Alicante CSIC-UMH  
San Juan de Alicante, 03550 Alicante*

La Real Academia de Farmacia se ha sumado con esta Mesa Redonda a las celebraciones que han conmemorado el centenario de la concesión del Premio Nobel de Medicina a Santiago Ramón y Cajal en 1906. Cajal trabajó incansablemente y nos donó un legado de una magnitud difícil de asimilar. Los descubrimientos de Cajal que más repercusión han tenido a lo largo de estos cien años están relacionados con la anatomía del sistema nervioso del adulto desde una concepción tan abierta y por delante de su tiempo que le permitió incluso predecir los flujos de información de la transmisión nerviosa. Sin embargo, fueron los embriones los que ayudaron a Cajal a elaborar al menos dos de sus doctrinas más importantes: la teoría neuronal y la teoría neurotrópica.

## **LOS EMBRIONES Y LA TEORÍA NEURONAL**

Cajal defendió que las células nerviosas eran estructuras individuales en contra de la visión de su tiempo que proponía al sistema nervioso como una red continua. Una de las razones por las que Cajal pudo afirmar la naturaleza individual de los «neuroblastos» fue su estudio de cortes de médula espinal de embriones de pollo de tres a cinco días de desarrollo. En estos estadios, los axones (prolon-

---

\* Dirección de contacto: Instituto de Neurociencias de Alicante. CSIC-UMH. Apartado de Correos 18. 03550 San Juan de Alicante (Spain). Telf.: 34 96 591 92 43. Fax: 34 96 591 95 61. e-mail: anieto@umh.es

gación larga de las neuronas que transmite la información) están creciendo y presentan unas terminaciones muy evidentes. A estas terminaciones Cajal las denominó conos de crecimiento, en un trabajo que publicó en julio de 1890 en la *Gaceta Sanitaria de Barcelona* (1) y que con algunas adiciones e ilustraciones publicó más tarde traducido al francés en *Anatomischer Anzeiger* (2). Cajal describió esta estructura de la siguiente forma: «*Esta fibra termina... por un engrosamiento ya simplemente redondeado y poco aparente, ya por un grumo cónico de base periférica. Este grumo terminal, que llamaremos cono de crecimiento, presenta finas extensiones ... que parecen insinuarse entre los demás elementos, fraguándose a viva fuerza un camino por el cemento intersticial*». La Figura 1 muestra la ampliación de uno de estos conos de crecimiento procedente de una preparación original de Cajal (3). Cajal comenta en su obra magistral *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados* (4), la fortuna que tuvo de descubrir el cono de crecimiento en los embriones para defender que las células nerviosas son estructuras independientes. Considera que con ese descubrimiento quedó zanjada la crítica de Hensen, quien alegaba que el hecho de que nadie había podido ver el cabo de una fibra en crecimiento, apoyaba que el sistema nervioso estaría formado por puentes entre dos células del mismo origen que se iban alejando sin haber sido nunca entidades separadas (5).

## LOS EMBRIONES Y LA TEORÍA NEUROTROPICA

La simple observación del cono de crecimiento y su descripción como la estructura que se fragua su camino hacia su destino tiene ya implicaciones que Cajal elabora poco después basándose en la *Teoría Quimotáxica* de Pfeffer (6). En su trabajo seminal del desarrollo de la retina (7), Cajal refiere a esta teoría para lanzar su doctrina de la *Teoría Neurotrópica* de la siguiente forma: «*Estudiando la evolución de la retina y la de los centros nerviosos, nos hemos hecho la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las causas mecánicas del crecimiento de las fibras nerviosas... y de la capacidad de las expansiones de conectar sin errores con ciertos corpúsculos? Sin negar la importancia de las influencias mecánicas, creemos que se podrían admitir condiciones análogas a las de la quimiotaxis propuesta por Pfeffer para los leuco-*

*citos. Las expansiones de los neuroblastos se orientarían en el seno de corrientes químicas e irían al encuentro de los corpúsculos secretores».*

En el párrafo anterior se elabora un principio general que, aunque descrito en el estudio de la retina, Cajal consideró aplicable a la migración de los axones de las distintas estructuras del sistema nervioso en desarrollo. Es inmediato extrapolarlo a la guía del cono de crecimiento del axón de la médula espinal del embrión en su camino hacia la placa del suelo (Figura 1). La placa del suelo es una estructura en la línea media de la médula a la que se dirigen los axones de las neuronas comisurales como estación intermedia antes de cruzar al otro lado. Con su teoría neurotrópica, Cajal sentó las bases de los mecanismos que guían a los axones hacia sus dianas. Sin embargo, hemos tenido que esperar más de cien años para conocer las moléculas implicadas. No fue hasta 1994 que se describió la primera molécula, denominada netrina, que se secreta desde la placa del suelo y actúa como una sustancia atrayente para el cono de crecimiento (8). Posteriormente se descubrió cuáles son los receptores del cono que se sienten atraídos por la netrina (9) y este mes de noviembre de 2006 se ha publicado el descubrimiento de otros receptores distintos, llamados Boc, que se sienten atraídos por una molécula distinta de la netrina también secretada por la placa del suelo (10).

### **LOS EMBRIONES, EL CÁNCER Y LA SORPRENDENTE VISIÓN DE CAJAL**

Además de su ingente trabajo en la descripción del sistema nervioso, Cajal prestó atención a otras muchas disciplinas, y de hecho, su *Manual de Anatomía Patológica* es una obra magna que describe con detalle «*degeneraciones, flegmasías infecciosas, neoplasias e histopatología de los órganos*», como menciona en el prólogo de una de sus diversas ediciones. Es muy destacable el estudio que realizó en la Anatomía Patológica de los carcinomas, y en este sentido tuvo de nuevo una visión muy por delante de su tiempo cuando describe las células que encuentra en los tumores de mama. Esta descripción tiene implicaciones muy importantes en relación con el conocimiento actual de la malignización tumoral (11).

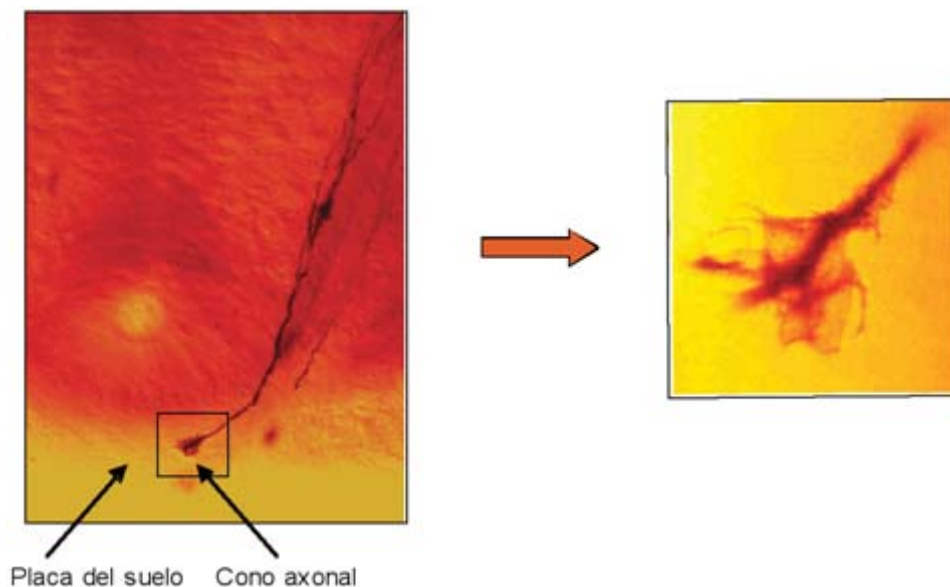


FIGURA 1. **Fotografía tomada de una preparación original de Cajal.** Se muestra el cono de crecimiento de un axón en su camino hacia la placa del suelo. Adaptado de Nieto (3).

La primera etapa en la formación de las metástasis de los carcinomas consiste en el desprendimiento de células del tumor primario para invadir territorios cercanos o entrar en el torrente linfático o circulatorio. Este proceso de migración celular ocurre de forma natural durante el desarrollo embrionario para la formación de tejidos cuyas células progenitoras nacen muy alejadas de su destino final. Hasta muy recientemente no se conocían las moléculas implicadas en estos procesos, pero ahora sabemos que son las mismas durante el desarrollo embrionario y la malignización tumoral. Por lo tanto, los embriones aún nos ayudan a entender cómo funcionan los procesos fisiológicos y nos dan las claves para entender la enfermedad. Es extraordinario leer cómo Cajal decía en 1900, refiriéndose a células del carcinoma de mama: «Las células están perfectamente sueltas... Explica la tendencia invasora de éstas, que, libres de... cementos de soldadura, pueden fácilmente emigrar por las lagunas conectivas» (11). Ahora sabemos que esas células tienen capacidad de separarse de sus vecinas, entre otras razones porque expresan una

molécula denominada Snail que las libera de «esos cementos de soldadura» y es fundamental para el desarrollo del embrión (12). Sin embargo, su activación en la vida adulta produce distintas patologías, como la fibrosis y la progresión de los tumores hacia la formación de las metástasis (13, 14).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) RAMÓN Y CAJAL, S. (1980a): Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gaceta Sanitaria de Barcelona*, 12: 413-419.
- (2) RAMÓN Y CAJAL, S. (1890b): À quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet. *Anatomischer Anzeiger*. 5: 609-613.
- (3) NIETO, M. A. (1996): Molecular Biology of axon guidance. *Neuron*. 17: 1039-1048.
- (4) RAMÓN Y CAJAL, S. (1899): *Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados*, p. 514. Imprenta y Librería de Nicolás Moya. Madrid.
- (5) HENSEN (1864): Die Entwicklung des Nervensystems. *Virchow's Archiv*. Bd. XXX.
- (6) PFEFFER, W. (1884): *Untersuch. Bot. Inst. Tübingen*. 1, 363.
- (7) RAMÓN Y CAJAL, S. (1893): *La rétine des vertébrés. La cellule*, vol. IX, 119-258.
- (8) KENNEDY, T. E.; SERAFINI, T.; DE LA TORRE, J. R. and TESSIER-LAVIGNE, M. (1994): Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 78: 425-435.
- (9) KEINO-MASU, K.; MASU, M.; HINCK, L.; LEONARDO, E. D.; CHAN, S. S.; CULOTTI, J. G. and TESSIER-LAVIGNE, M. (1996): Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor *Cell*. 87: 175-185.
- (10) OKADA, A.; CHARRON, F.; MORIN, S.; SHIN, D. S.; WONG, K.; FABRE, P. J.; TESSIER-LAVIGNE, M. and McCONNELL, S. K. (2006): Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature*. 444: 369-373.
- (11) RAMÓN Y CAJAL, S. (1900): *Manual de Anatomía Patológica*. 3.<sup>a</sup> Ed. Madrid.
- (12) CANO, A.; PÉREZ, M. A.; RODRIGO, I.; LOCASCIO, A.; BLANCO, M. J.; DEL BARRIO, M. G.; PORTILLO, F. and NIETO, M. A. (2000): The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol*. 2: 76-83.
- (13) BARRALLO-GIMENO, A. and NIETO, M. A. (2005): The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 132: 3151-3161.
- (14) BOUTET, A.; DE FRUTOS, C. A.; MAXWELL, P. H.; MAYOL, M. J.; ROMERO, J. and NIETO, M. A. (2006): Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J*. 25: 5603-5613.





————— *Artículo original* —————

## Vanadium *in vivo* interaction with cefotaxime

Recibido el 2 de octubre de 2006

MADRIGAL, P.<sup>+</sup>, DOADRIO, A. L.<sup>\* +</sup>, GONZÁLEZ, P.<sup>++</sup> and  
CASAS, J.<sup>+++</sup>

<sup>+</sup> *Department of Inorganic Chemistry and Bioinorganic.  
School of Pharmacy. University Complutense. Madrid (Spain).*

<sup>++</sup> *Experimental Investigation Unit. Teaching Hospital San Carlos.  
Madrid (Spain).*

<sup>+++</sup> *Department of Toxicology and Legal Medicine.  
School of Medicine. University Complutense. Madrid (Spain).*

### ABSTRACT

The presence of V(IV) in penicillin and cephalosporin solutions, has been shown previously, *in vitro*, to promote the degradation of the penicillins and cephalosporins studied to their corresponding penicilloic and cephalosporanic acids. HPLC studies provided an additional evidence for the reaction mechanism. The mechanisms of V(IV) catalysis involve a ternary complex. This work was undertaken to study the consequences of this degradation, *in vivo*, upper the pharmacokinetic and pharmacodynamic of Cefotaxime, being these consequences a lower concentration of free cefotaxime in blood, liver, spleen, kidney, lung and heart when there was intoxication with vanadium. The differences more significant between rats with vanadium and without it were observed in liver, lung and kidney.

**Key words:** Cefotaxime.—Vanadium.—HPLC.—Pharmacokinetic.—Pharmacodynamic.

---

\* Author to whom correspondence should be addressed: Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid (Spain). Email: adoadrio@raf.es

## RESUMEN

### Interacción *in vivo* del Vanadio con Cefotaxima

Anteriormente, en estudios por HPLC, hemos demostrado *in vitro*, que la presencia de V (IV) en las disoluciones de penicilinas y cefalosporinas, aumentan la degradación de éstas en sus correspondientes ácidos penicilóico y cefalosporánico. Los mecanismos de la catálisis de V (IV) involucran a un complejo ternario. En este trabajo se estudia las consecuencias de esta degradación, *in vivo*, de Cefotaxima, en sangre, hígado, bazo, riñón, pulmón y corazón, para ver las consecuencias de la intoxicación de vanadio. Las diferencias más importantes en ratas intoxicadas con vanadio se observaron en hígado, pulmón y riñón.

**Palabras clave:** Cefotaxima.—Vanadio.—HPLC.—Farmacocinética.—Farmacodinamia.

## INTRODUCTION

The transition metal interactions to penicillins (1-5) and cephalosporins (6) were studied previously by spectrophotometric and potentiometric methods. In the case of the cefotaxime, as impurity, also for HPLC (7).

In those studies, it was observed that the effect of V(IV) on the penicillins and cephalosporins was to promote their degradation to coordination complexes of V(IV) and the corresponding penicilloic and cephalosporanic acids (see Figure 1). Other authors have studied the formation of the complex, *in vitro*, between V(IV) and penicillins and cephalosporins, by means of the reaction mechanisms, evaluating the stability constants for the interaction between V(IV) and these antibiotics.

This communication presents the way thought which the formation of the complex between V(IV) and cefotaxime affects on the concentration, distribution and stability of this cephalosporin. The importance of the formation of this complex stems from the lowest concentration of free cefotaxime in blood and organs only when takes place intoxication. This concentration could be lower than the concentration of the cephalosporin that is required to kill the microorganisms that cause the infection.

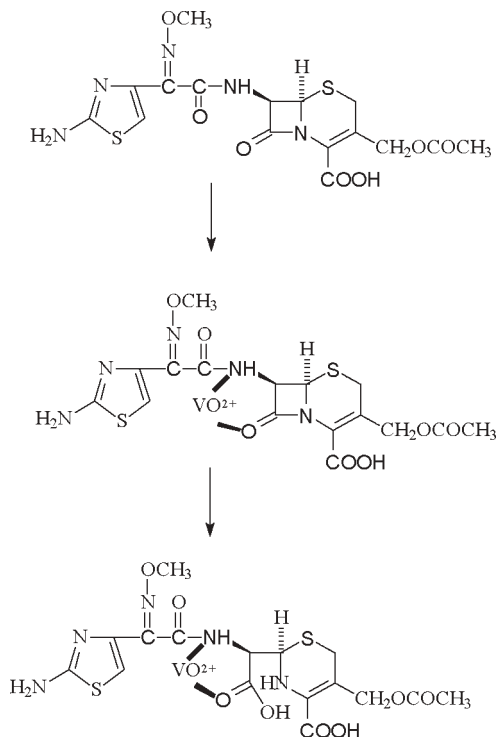


FIGURE 1. *Mechanism of hydrolytic reaction of the Cefotaxime with addition of vanadium.*

So that we could reach those results, we compared the concentration, distribution and stability of the free cefotaxime in rats without toxic with poisoned rats, after 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after administrating this antibiotic. This comparison was achieved by measuring the concentration of free cefotaxime in blood, liver, spleen, kidney, lung and heart homogenates of poisoned rats and rats without the toxic. The methodology applied for this purpose was HPLC since this technique facilitates the separation of the complex V(IV)-cefotaxime, the corresponding V(IV)-cephalosporanic acid chelate, free cefotaxime and their compounds resulting from the degradation of cefotaxime.

## MATERIALS AND METHODS

### Biology Materials

Seventy five Wistar rats, males of 250 to 300g weight, were used throughout this work and supplied by the warehouse of the Complutense University of Madrid.

Animals were maintained in one of the rats room of the warehouse. The temperature was 20° C, the relative humidity was 55% and the intensity of the light inside the room was 400 LUX using cycles of 12 hours of light/darkness.

Animals were distributed by groups in order to assay different treatments. One group of 35 rats with vanadium (group A), which was poisoned with a nasogastric sound administering to their everyday 4 mL of a solution of 4 mg/mL of a vanadium (III) acetylacetonate during 8 days. The groups left were arranged one of them with 35 rats (group B), and the other one with 5 rats (group C), both of them without metal.

Groups A and B were put under treatment with an intramuscular administration of an only dose of 200 mg of cefotaxime.

Group C was used as a control to know the different substances which belonged to the animals in order to not to be confusing with the free cefotaxime throughout the study.

Five rats of the groups A and B, were sacrificed after 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes after the antibiotic administration. The blood, liver, spleen, kidney, lung and heart of those rats were extracted and after that, they were measuring their free cefotaxime concentration by HPLC.

### Chemical and Reagents

Cefotaxime sodium was supplied by the Teaching Hospital of Madrid. Vanadium (III) acetylacetonate was obtained from Merck. Trichloroacetic acid supplied by Scharlau, this substance was used in concentrations of 10% and 20%.

The mobile phase reagents used were HPLC grade methanol from Scharlau. Water used was from a Milli-Rho-Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Phosphate buffer (0.1 M) was prepared with phosphate monopotasic anhydride and o-phosphoric acid supplied by Merck.

## Apparatus and instrument

Kontron high-pressure liquid chromatograph equipped with a Kontron 420 pump. An automatic injector with 6 valves Kontron Auto Sampler 460. A variable-wavelength UV detector of Kontron Uvikon 735 LC. Phenomenex C<sub>18</sub> column (25 x 0.46 cm), filled with particles of 5 µm, besides this column of separation, a precolumn and a protective column filled with the same material that the first column were used. A Kontron Station Data with D450 software was used to control the detector and injector, on the other hand it allowed the integration of the chromatogram peaks and it cuantificated the results.

## ANALYTICAL PROCEDURE

The extraction of cefotaxime in blood was carried out by means of protein precipitants such as trichloroacetic acid (8) in the concentration 10%. 1.5 mL of this reagent was added to 0.5 mL of blood. This mixture was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was collected through a Pasteur pipet and filtered through MFS disks of nylon of 0.4 mm of diameter. After that, it was assayed by HPLC.

The extraction of cefotaxime in organs such as liver, spleen, kidney, lung and heart, was carried out by means of trichloroacetic acid 20%. 2 mL of this reagent were added to 0.5 g of dry weight of each organ. Each mixture was done homogeneous and was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was collected through a Pasteur pipet and filtered through MFS disks of nylon of 0.4 mm of diameter. It was later assayed by HPLC.

Isocratic HPLC conditions used along this experiment were: the mobile phase consisted of a 20:80% solution (v/v) of methanol in 0.01 M  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ . The pH of the final solution was adjusted to 3.2 with phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min. Chromatograph was loaded with 40  $\mu\text{L}$  of each sample. Chromatograms were run at room temperature. Samples were detected at 254 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Concentration of cefotaxime

The concentration homogenates of free cefotaxime was measured in blood, liver, kidney, spleen, lung and heart of the killed rats at the 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after the administration of cefotaxime, those rats were the rats with vanadium and antibiotic and the rats with cefotaxime only. As there were 5 rats by each time, the average concentration of free cefotaxime was calculated by each group of 5 rats that were killed at each time.

TABLE I. Average concentrations (mg/mL) of free cefotaxime in rats without vanadium

Samples	Time (Min)						
	30	60	90	120	150	180	210
<b>BLOOD</b>	0.80	0.46	0.25	0.14	0.08	0.06	0.02
<b>LIVER</b>	$6.03 \cdot 10^{-5}$	$2.68 \cdot 10^{-5}$	$2.16 \cdot 10^{-5}$	$1.71 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-5}$	$1.37 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$
<b>SPLEEN</b>	$2.70 \cdot 10^{-5}$	$1.58 \cdot 10^{-5}$	$1.45 \cdot 10^{-5}$	$0.53 \cdot 10^{-5}$	$0.41 \cdot 10^{-5}$	$0.39 \cdot 10^{-5}$	$0.38 \cdot 10^{-5}$
<b>KIDNEY</b>	$24.2 \cdot 10^{-5}$	$18.1 \cdot 10^{-5}$	$10.6 \cdot 10^{-5}$	$5.90 \cdot 10^{-5}$	$5.01 \cdot 10^{-5}$	$4.81 \cdot 10^{-5}$	$3.17 \cdot 10^{-5}$
<b>LUNG</b>	$7.19 \cdot 10^{-5}$	$5.26 \cdot 10^{-5}$	$3.52 \cdot 10^{-5}$	$3.02 \cdot 10^{-5}$	$1.33 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-5}$	$0.46 \cdot 10^{-5}$
<b>HEART</b>	$2.56 \cdot 10^{-5}$	$1.87 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-5}$	$1.14 \cdot 10^{-5}$	$1.08 \cdot 10^{-5}$	$0.86 \cdot 10^{-5}$	$0.85 \cdot 10^{-5}$

In blood and in the rest of organs such as liver, spleen, lung, heart and kidney, we can observe in the Table I that the cefotaxime

concentration in rats without vanadium is lesser in accordance with the time that has elapsed since the administration of the antibiotic. In the Table II, the same case is observed in rats with vanadium, the greatest cefotaxime concentration is at 30 min. after the administration of this cephalosporin, and this concentration decreases since the moment of the administration.

TABLE II. Average concentrations (mg/mL) of free cefotaxime in rats with vanadium

Samples	Time (Min)						
	30	60	90	120	150	180	210
<b>BLOOD</b>	0.51	0.25	0.18	0.13	0.12	0.02	0.01
<b>LIVER</b>	$4.36 \cdot 10^{-5}$	$1.72 \cdot 10^{-5}$	$1.41 \cdot 10^{-5}$	$1.38 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-5}$	$0.32 \cdot 10^{-5}$	$0.15 \cdot 10^{-5}$
<b>SPLEEN</b>	$1.46 \cdot 10^{-5}$	$1.39 \cdot 10^{-5}$	$1.38 \cdot 10^{-5}$	$0.66 \cdot 10^{-5}$	$0.38 \cdot 10^{-5}$	$0.37 \cdot 10^{-5}$	$0.21 \cdot 10^{-5}$
<b>KIDNEY</b>	$20.6 \cdot 10^{-5}$	$12.8 \cdot 10^{-5}$	$7.58 \cdot 10^{-5}$	$5.42 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-5}$	$2.38 \cdot 10^{-5}$	$1.36 \cdot 10^{-5}$
<b>LUNG</b>	$3.86 \cdot 10^{-5}$	$2.59 \cdot 10^{-5}$	$1.69 \cdot 10^{-5}$	$1.59 \cdot 10^{-5}$	$1.31 \cdot 10^{-5}$	$0.45 \cdot 10^{-5}$	$0.23 \cdot 10^{-5}$
<b>HEART</b>	$1.88 \cdot 10^{-5}$	$1.68 \cdot 10^{-5}$	$1.12 \cdot 10^{-5}$	$1.11 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-5}$	$0.66 \cdot 10^{-5}$	$0.29 \cdot 10^{-5}$

Concentrations of cefotaxime, in rats with vanadium and without it, appeared to decline in a biphasic manner. This decrease in the cefotaxime concentration happened in the same way that in adults with a normal renal function (9, 10).

In Table I and II, in all samples of the 2 groups of rats, it could be noticed two phases in the decrease of cefotaxime concentration. An initial phase averages 30-90 min. where the concentration decreased slower.

Cefotaxime concentration does not only change with time, but also changes in accordance with the intoxication with vanadium.

In rats without vanadium the free cefotaxime concentration is greater than the concentration in rats with the metal. This fact happened in blood as well as in the other organs analysed in almost all times what have been described. The differences more significant

have been seen in liver, kidney and lung, where there is more concentration of free cefotaxime in rats without vanadium than in rats with it. In spleen and heart, those differences were less significant, although they are very appreciable. In blood, concentrations of free cefotaxime were greater in rats without vanadium, but the differences between concentrations are not as appreciable as in the others samples that have been analysed. So, the presence of vanadium is an influential factor in the concentration of free cefotaxime.

This observation has been supported with the help of a statistical analysis, here the means of concentrations of free cefotaxime, in blood, liver, spleen, lung, heart and kidney of rats without vanadium and of the rats with it, at 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min. after administration of this cephalosporin, have been compared. This comparison has been done by means of a T distribution with  $p < 0.05$  (Table III).

TABLE III. *Differences more significant in concentrations of free cefotaxime between rats with vanadium and without it*

Samples	Time (Min)	P	Value of T
<b>BLOOD</b>	60	0.04	2.40
	90	0.02	2.68
	180	$6.84 \cdot 10^{-4}$	5.35
<b>LIVER</b>	60	$7.78 \cdot 10^{-3}$	3.52
	90	0.04	2.44
	180	$5.46 \cdot 10^{-6}$	10.6
	210	$2.48 \cdot 10^{-9}$	28.5
<b>SPLEEN</b>	30	$1.37 \cdot 10^{-5}$	9.37
	210	$1.37 \cdot 10^{-5}$	6.03
<b>KIDNEY</b>	60	0.01	3.24
	90	$5.27 \cdot 10^{-5}$	7.79
	150	$6.11 \cdot 10^{-4}$	5.44
	180	$1.22 \cdot 10^{-5}$	9.52



TABLE III. *Differences more significant in concentrations of free cefotaxime between rats with vanadium and without it (cont.)*

Samples	Time (Min)	P	Value of T
	210	$5.89.10^{-5}$	7.76
	30	$4.03.10^{-6}$	11.04
	60	$8.23.10^{-8}$	18.28
	90	$1.10^{-5}$	9.77
<b>LUNG</b>	120	$1.44.10^{-4}$	6.75
	180	$4.29.10^{-7}$	14.79
	210	$7.28.10^{-4}$	5.29
<b>HEART</b>	30	0.01	3.01
	180	$7.09.10^{-3}$	3.58
	210	$1.16.10^{-6}$	12.9

Therefore, in all those times is dismissed the nule hypothesis and the averages differences of cefotaxime concentrations were statistically significant. As deduced from these differences between the free cefotaxime concentration in rats with and without vanadium did not happen randomly, so those differences in the concentration could be due to the formation of antibiotic/metal complex, remaining a lesser concentration of free cefotaxime.

### Distribution of cefotaxime

Tables I and II show the greatest concentration of cefotaxime in blood. In the assayed organs the concentration of this cephalosporin is decreasing in the sense: kidney > liver > lung > spleen > heart. Therefore cefotaxime is mainly stored in kidney. This fact is same in the 2 groups of rats A and B, and because of this, the metal is not an influential factor in the distribution of cefotaxime.

## Stability of cefotaxime

The decrease rate constants of the concentration of free cefotaxime in rats with vanadium and in rats without it are of first-order, according to the best values of correlation coefficient. The absolute values of the logarithmic of the observed constants  $K$  are shown in Table IV, where the highest value of  $\log K$  is in heart in the 2 groups of rats, therefore the cefotaxime is more stable in heart than in the others studied organs.

TABLE IV. *The absolute values of the logarithmic of the observed constant  $K$*

	Rats without vanadium	Rats with vanadium
<b>BLOOD</b>	1.73	1.73
<b>LIVER</b>	2.16	1.79
<b>SPLEEN</b>	1.93	1.93
<b>KIDNEY</b>	1.93	1.85
<b>LUNG</b>	1.86	1.85
<b>HEART</b>	2.16	2.03

In rats without vanadium the stability of cefotaxime in organs is decreasing in the sense: heart and liver > kidney and spleen > lung. In rats with vanadium the stability is: heart > kidney > liver, spleen and lung.

In blood it was observed the lowest stability of cefotaxime in the 2 groups of rats.

Therefore in rats that have been or not intoxicated with vanadium the highest and less stability is at the same site.

It is not only important the presence of vanadium in the concentration, distribution and stability of cefotaxime, but also the presence of the metal results to be crucial in the activity of this cephalosporin because of the decrease of the free cefotaxime concentration due to the metal.

If there were a lower concentration of free cefotaxime, it would not reach the minimum inhibitory concentration to kill the microorganism that cause the infection, so that the activity of cefotaxime will decrease or even the cephalosporin will not have activity in many cases. So, in poisoned patients with vanadium, it is very important to bear in mind this fact when they have to follow a course of treatment with cefotaxime.

## REFERENCES

- (1) DOADRIO, A. L.; SOTELO, J. B.; DOADRIO, J. C.; ORENGA, R.; MAYORGA, A. (1994): Toxic-ions catalyzed hidrolisis of Amoxicililin: HPLC Kinetic studies. *Ecl. Quim.* 19: 37-47.
- (2) CRESSMAN, W. A.; SUGITA, E. T.; DOLUISIO, J. T.; NIEBERGAL, P. J. (1969): Cupric ion-catalyzed hidrolisis of Penicellins: Mechanism and sites of complexation. *J. Pharm. Sci.* 58: 1471-1476.
- (3) DOADRIO, A. L.; DOADRIO, J. C.; IRIBARREN, M. (1992): Metal-ions catalyzed hidrolisis of Ampicillin: RPHPLC-IEXHPLC Kinetic studies. *Ecl. Quim.* 17: 41-52.
- (4) DOADRIO, A.; MIRASIERRA, M. G. (1969): Determinación espectrofotométrica de la Ampicilina como quelato cúprico. *An. Real Acad. Farm.* 35: 115-131.
- (5) DOADRIO, A.; MIRASIERRA, M. G. (1973): Determinación espectrofotométrica de la Metampicilina como quelato cúprico. *An. Real Acad. Farm.* 39: 183-191.
- (6) MAYORGA, A. (1999): Interacción de metales tóxicos con Ceftriaxona: complejos con Cu y V. Thesis presented to obtain the Doctor grade. University Complutense. Madrid.
- (7) CHI-HUA SUN; HUI-PO WANG (1998): Methods in the preparation of D-Phenylglycine containg cefotaxime. *J. Food and Drugs Anal.* 6: 477-484.
- (8) BLANCHAR, J. (1981): Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to HPLC analysis. *J. Chromatogr.* 226: 445-460.
- (9) PATEL, K. B.; NICOLAU, D. P.; NIGHTINGALE, C. H., QUINTIALINI, R. (1995): Pharmacokinetics of Cefotaxime in healthy volunteers and patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 49-55.
- (10) Drug Informat American Hospital Formulary Service (AHFS): 92-124.



————— *Artículo original* —————

## **Heme responsiveness *in vitro* is a common feature shared by the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ kinase family**

Recibido el 24 de noviembre de 2006

SATURNINO HERRERO<sup>+</sup>, JUAN JOSÉ BERLANGA,  
ISABELA ALONSO y CÉSAR DE HARO<sup>\*</sup>

*Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
Universidad Autónoma de Madrid,  
Cantoblanco, 28049 Madrid (Spain)*

### **ABSTRACT**

Four distinct eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) kinases phosphorylate eIF2 $\alpha$  at Ser-51 and regulate protein synthesis in response to cellular stress conditions. This kinase family includes the heme-regulated inhibitor (HRI); the double-stranded RNA-dependent kinase (PKR); the GCN2 protein kinase; and the endoplasmic reticulum-resident kinase (PERK). HRI mediates protein synthesis inhibition in heme-deficient reticulocyte lysates. Although HRI contains two putative heme regulatory motifs (HRMs) that are not present in other eIF2 $\alpha$  kinases, the significance of these motifs in heme regulation is not clear. In fact, it had been characterized two novel eIF2 $\alpha$  kinases from *Schizosaccharomyces pombe* that lacked any of the HRMs, but were sensitive to heme regulation *in vitro*. To investigate the importance of different regions in the regulation of HRI by heme, specific HRI mutants were generated, and kinase activities and heme responsiveness were analyzed *in vitro*. Mutational analysis indicated that the heme regulatory motifs

---

\* Corresponding author: César de Haro, Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», CSIC-UAM, Facultad de Ciencias, Cantoblanco, 28049 Madrid (Spain).

Phone: 34-91-4978432. Fax: 34-91-4974799. Email: [cdeharo@cbm.uam.es](mailto:cdeharo@cbm.uam.es)

<sup>+</sup> Present address: Institute of Applied Biosciences, Dept. of Applied Microbiology, University of Karlsruhe, Germany.

*Abbreviations:* HRM, heme regulatory motif; SEK1 & SEK2, *S. pombe* eIF2 $\alpha$  kinases.

were spread around some regions in the HRI catalytic domain, outside of the HRMs. In accordance with these results, both the autokinase and the eIF2 $\alpha$  kinase activities of three distinct eIF2 $\alpha$  kinases, including the human PKR, the mouse GCN2 and the *Drosophila* PERK were inhibited *in vitro* by hemin. Although the known regulatory mechanisms of these eIF2 $\alpha$  kinases are very different, the data reported here indicate that all known eIF2 $\alpha$  kinases are regulated *in vitro* by hemin. This finding provides evidence that hemin represents a regulatory mechanism unique to eIF2 $\alpha$  kinases and underscores the role of hemin in the translational regulation of eukaryotic cells.

**Key words:** eIF2 $\alpha$  kinases.—Translational control.—Heme-regulated kinase.—Heme regulatory domain.

## RESUMEN

### La respuesta a hemina *in vitro* es una característica compartida por todos los miembros de la familia de las eIF2 $\alpha$ quinasas

Las cuatro eIF2 $\alpha$  quinasas eucarióticas fosforilan el residuo Ser-51 de la subunidad alfa del factor de iniciación 2 y regulan la síntesis de proteínas en respuesta a situaciones de estrés celular. Esta familia de proteínas quinasas está formada por el inhibidor regulado por hemina (HRI); la quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR); la proteína quinasa GCN2 y la quinasa residente en el retículo endoplásmico (PERK). El HRI inhibe la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo deficientes de hemina. Aunque el HRI contiene dos supuestos motivos reguladores de hemina (HRMs), que no están presentes en las otras eIF2 $\alpha$  quinasas, no está claro aún el papel de estos motivos en la regulación por hemina. De hecho, se han caracterizado dos nuevas eIF2 $\alpha$  quinasas de *Schizosaccharomyces pombe* que carecen de dichos HRMs, pero son sensibles a la regulación por hemina *in vitro*. Un análisis mutacional indicó que los motivos reguladores de hemina estaban dispersos a lo largo del dominio catalítico, fuera de los HRMs. De acuerdo con estos resultados, las actividades autoquinasa y eIF2 $\alpha$  quinasa de tres eIF2 $\alpha$  quinasas distintas, la PKR humana, la GCN2 de ratón y la PERK de *Drosophila*, se inhibían por hemina *in vitro*. Aunque los mecanismos de regulación de todas estas eIF2 $\alpha$  quinasas son muy diferentes, nuestros resultados indican que todas las eIF2 $\alpha$  quinasas se regulan por hemina *in vitro*. Este descubrimiento soporta la evidencia de que la hemina representa un mecanismo de regulación específico de las eIF2 $\alpha$  quinasas, y subraya su papel en la regulación de la traducción de células eucarióticas.

**Palabras clave:** eIF2 $\alpha$  quinasas.—Control de la Traducción.—Quinasa regulada por hemina.—Dominio regulador de hemina.

## INTRODUCTION

In eukaryotic cells, protein synthesis is mainly regulated at the level of initiation of mRNA translation. The reversible phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) is a well-characterized mechanism of translational control in response to a wide variety of cellular stresses, including nutrient starvation, iron deficiency, heat shock, UV irradiation and viral infection (1, 2). Four different eIF2 $\alpha$  kinases have been identified that specifically phosphorylate eIF2 $\alpha$  on Ser-51. All known eIF2 $\alpha$  kinases share a conserved kinase domain linked to unique regulatory regions. Thus, HRI is activated both by heme deficiency and under conditions of heat shock and oxidative stress (3). PKR is induced by interferon (IFN) and activated by double-stranded RNA (dsRNA) during viral infection (4). GCN2 (general control non-derepressible-2) is an eIF2 $\alpha$  kinase that is activated by amino acid or serum deprivation and UV irradiation (5-7). The fourth eIF2 $\alpha$  kinase, PERK, is activated by unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) (8, 9). It has recently cloned and characterized two novel eIF2 $\alpha$  kinases from the fission yeast *S. pombe* (named SEK1/Hri1p and SEK2/Hri2p) both of which show higher homology with mammalian HRI than with other eIF2 $\alpha$  kinases (10).

HRI, found most abundantly in erythroid cells, serves to limit globin protein synthesis when the levels of available heme are low. However, the presence of HRI mRNA and HRI activity in non-erythroid tissues and in NIH 3T3 cells raises the possibility of additional regulatory roles for HRI (11). The eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 was originally characterized in *Saccharomyces cerevisiae* and GCN2 homologs have been identified in *Drosophila melanogaster* (12) and mammals (5), suggesting that GCN2 might be the founding and also the best conserved member of the eIF2 $\alpha$  kinase family (2). PERK was originally identified in rat pancreatic islet cells (8) and, recently, PERK homologs have been found in mouse, human, and *Drosophila melanogaster* (9, 13). Interestingly, when activated by their cognate upstream stress signals, the mammalian PERK and GCN2 repress translation of most mRNAs but selectively increase translation of ATF4 mRNA, a member of the activating transcription family (14).

All distinct eIF2 $\alpha$  kinases share extensive homology in the kinase catalytic domain. Apart from the 12 conserved subdomains found in most protein kinases, they have additional characteristic features, including an insert region between subdomains IV and V and a conserved sequence in subdomain V that distinguishes them from other serine/threonine kinases (15). Especially notable is the presence of this conserved motif, essentially LY/HIQME/QY/LC, located N-terminal to subdomain V in all of the known members (up to 20) of this kinase family, suggesting that this motif might contain a putative substrate-specific recognition domain (16).

HRI is regulated by heme, and it seems that heme binds directly to HRI and blocks kinase activity (17). In fact, it has been shown that HRI is a hemoprotein with two distinct heme-binding sites (17, 18). Both of them, the N-terminus and the kinase insertion, which are unique to HRI, appear to be involved in the heme regulation of HRI (18). Furthermore, HRI is among six hemoproteins that have a putative heme regulatory motif (HRM) (19); HRI contains two of these motifs that are not present in other eIF2 $\alpha$  kinases, although the role of the HRMs in the heme regulation of full-length HRI remains uncertain. Thus, the heme-binding site responsible for the reversible heme regulation of HRI must be determined in order to understand the mechanism of the regulation of HRI by heme.

In this study we have examined the effects of several deletions and point mutations in specific regions of HRI on its activity by *in vitro* assays. We have also tested these mutants of HRI for responsiveness to heme. Our findings indicate that none of three unique regions in HRI, the N-terminus, the kinase insertion and the C-terminus are required for the regulation of HRI by heme. Furthermore, we have found that both the autokinase and the eIF2 $\alpha$  kinase activities of the other members of the eIF2 $\alpha$  kinase family, such as PKR, GCN2 and PERK, were also sensitive to hemin *in vitro*. We conclude that the heme-binding site responsible for the reversible heme regulation is located within the eIF2 $\alpha$  kinase domain and this conserved motif(s) is characteristic of all known members of the eIF2 $\alpha$  kinase family.



## MATERIAL AND METHODS

### HRI Mutagenesis and Plasmid Construction

All HRI expression constructs were generated from pRSETB-MHRI plasmid, which harbors wild type (wt) mHRI (11). Single point mutations C409A and C550A were made by using the QuickChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) as described by the manufacturer, using the mutagenic primers shown in Table I. HRI  $\Delta 8$  and HRI  $\Delta 8$ /C550A were generated from pRSETB-MHRI and pRSETB-MHRI/C550A plasmids, respectively, by substitution of the cDNA fragment encoding aa 1 to 413 with a PCR generated fragment encoding aa 1 to 405. The resultant plasmids, pRSETB-MHRI  $\Delta 8$  and pRSETB-MHRI  $\Delta 8$ /C550A, encode HRI proteins lacking the 406 to 413 aa residues alone, or together with the C550A point mutation. To generate the HRI  $\Delta 137$ /C409A/C550A mutant, the pRSETB-MHRI C409A/C550A plasmid was cut with *Bam*HI, yielding three fragments. The fragment corresponding to the HRI central region (aa 138-501) was subcloned to produce a plasmid encoding an HRI product that lacks the 1 to 137 aa residues and contains the C409A and C550A mutations. HRI 138-580/C409A/C550A was generated by substituting the Gln-581 CAA codon for a stop codon (UAA) in the pRSETB-MHRI  $\Delta 137$ /C409A/C550A plasmid.

HRI Q4 chimera was obtained as follows: the whole pRSETB-MHRI plasmid without the region corresponding to the HRI kinase insert domain (residues 235-389) (11) was amplified by PCR, introducing restriction sites at both ends. The kinase insert domain (residues 656-807) of GCN2 (5) was also amplified by PCR introducing the same restriction sites. Both generated DNA fragments were ligated to produce a pRSETB-MHRI Q4 vector encoding an HRI protein with the MGCN2 insert sequence.

### Prokaryotic expression of HRI proteins

The pRSETB-MHRI-wt and the pRSETB-MHRI-mutant plasmids were used to transform a competent BL21 (DE3) pLys S strain of *E. coli*. Protein expression and bacterial lysis were done as previously

described (11). Bacterial lysates were diluted (1/100) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) and assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$  as described below.

TABLE I. Sequences of mutagenic HRI oligonucleotides

Construct	Mutagenic primer*
HRI C409A	5'-GTGGACGAAGCTGCT <b>GCT</b> CCCTATGTTATGGC (sense) 5'-GCCATAACATAGGGAG <b>G</b> CAGCAGCTTCGTCCAC (antisense)
HRI C550A	5'-CCCTCAGTAAAAGG <b>GCT</b> CCGGTGCAAGCC (sense) 5'-GGCTTGCACCGGAG <b>GC</b> CCCTTTTACTGAGGG (antisense)
HRI 138-580	5'-CAGAGTGAGCTTTTTT <b>TAA</b> ACA ACTGGAAATG (sense) 5'-CATTTCAGTTGTTTAAAAA <b>G</b> GCTCACTCTG (antisense)

\* Underlined codons correspond to the indicated amino acid mutations and the generated stop codon. The changed nucleotides are marked in bold.

## Cell Culture and Transfection

HEK 293T cells were grown and transfected as previously described (20). The plasmids used were the pcDNA3.1/Myc-His vectors (Invitrogen) containing the coding region of mouse GCN2 (pcMGCN2-WT) (5), mouse HRI (pcMHRI-WT) (11), human PKR (provided by Dr. J. Gil), *Drosophila melanogaster* PERK (13), or rat  $\zeta$ PKC (21) in frame with a C-terminal tag encoding the *myc* epitope and a polyhistidine metal-binding peptide.

## Affinity Purification and *in vitro* Phosphorylation Assays

Affinity purification of proteins was performed as previously described (20). The eluted proteins from the metal affinity resin as well as the *E. coli* lysates containing the HRI wild type and mutant proteins were assayed for their ability to phosphorylate eIF2 $\alpha$  as reported previously (12, 22), with modifications as described. In a total volume of 20  $\mu$ l, 5  $\mu$ l of kinase fractions were incubated with various concentrations of hemin (0-4  $\mu$ M) for 30 min at 30° C in the kinase buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM

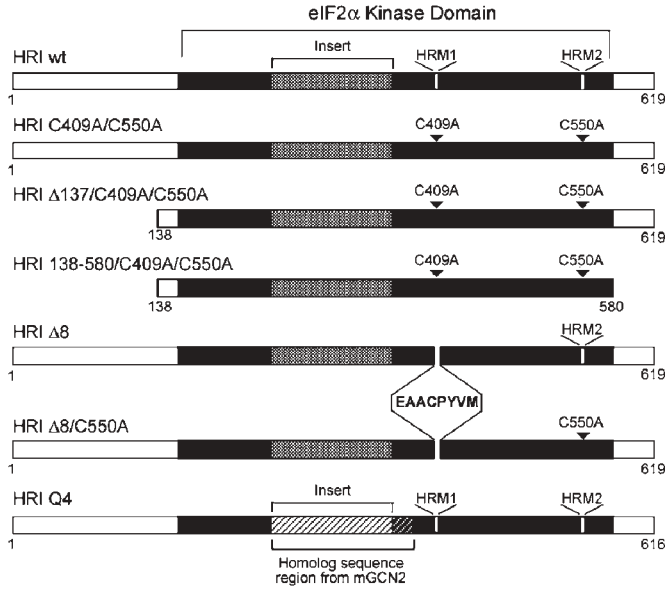
Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.25 mg/ml BSA, 50 μM ATP) containing purified rabbit reticulocyte eIF2 (0.5 μg) and 3 μCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol). When PKR or GCN2 was assayed the reaction mixtures also included 1 μg/ml poly(I)·poly(C) dsRNA or 2.5 μg/ml (0.65 nM) Sindbis virus RNA, respectively. Phosphorylation of casein (Sigma) by highly purified casein kinase II (CKII) from rat liver was carried out as described (22). Briefly, purified CKII (0.01 U/ml) was incubated for 10 min at 30° C with 66 μg/ml casein as substrate and 3 μCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) in a final volume of 30 μl containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 50 μM ATP. ζPKC kinase assay was as for eIF2α kinases, except for the substitution of Mg(OAc)<sub>2</sub> by MgCl<sub>2</sub> and eIF2α by 3 μg of myelin basic protein (MBP) as substrate. Incubations were terminated by the addition of SDS sample buffer and phosphoproteins were analyzed by both SDS-PAGE (23) on a 10 or 12.5% polyacrylamide gel (28.5:1 (w/w) acrylamide/bisacrylamide) and autoradiography using Agfa Curix RP2 film and an Amersham-Pharmacia intensifying screen. The areas corresponding to the phosphorylated α-subunit of eIF2 were scanned at 633 nm in a computing 300 A densitometer (Molecular Dynamics, Inc.).

## RESULTS

All known HRIs contain two putative heme regulatory motifs (HRM): ACPYVM and RCPVQA, which are located within the catalytic domain [(11) and Fig. 1B] and are not present in other eIF2α kinases. To date, the significance of these motifs in the heme regulation of HRI is unknown.

To understand the regulation mechanism of HRI by heme, we designed and constructed a series of mutants (Fig. 1A), including point mutations of the two invariant cysteine residues in the HRMs (HRI C409A/C550A) alone or together with either a large N-terminal deletion (HRI Δ137/C409A/C550A) or deletions that remove both the N-terminal and the C-terminal domains (HRI 138-580/C409A/C55A). The HRI Δ8 mutant contains a deletion of amino acids 406-413 that removes the entire HRM1. The HRI Δ8/C550A mutant also contains a single point mutation of conserved cysteine in HRM2. In addition,

**A**



**B**

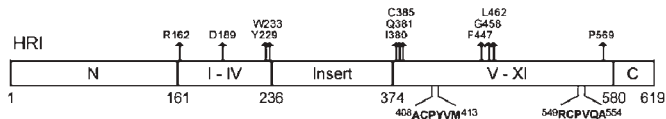


FIGURE 1. **A**, the 619 amino acid wild type HRI sequence is illustrated by a large box and shown at the top. The black boxes represent the conserved two lobes of the eIF2 $\alpha$  kinase domain, separated by a large insert region (stippled boxes) between subdomains IV and V. Position of the two heme regulatory motifs (HRM1 and 2) within the catalytic domain is shown. Six generated mutants are shown: HRI C409A/C550A (in which the conserved cysteines in both HRM1 and HRM2 are mutated to alanine); HRI  $\Delta$ 137/C409A/C550A (previous mutant in which the first 137 amino acids were deleted); HRI 138-580/C409A/C550A (previous mutant with the indicated deletion at the C-terminus); HRI  $\Delta$ 8 (an eight-amino acid deletion in HRM1); HRI  $\Delta$ 8/C550A (mutant containing HRM1 deletion and C550A substitution); HRI Q4 (in which the insert region of HRI kinase was replaced by the corresponding insert region from mouse GCN2). The numbers refer to the amino acid residues. **B**, the five domains of mouse HRI included the N-terminus (N); the conserved two lobes of the eIF2 $\alpha$  kinase domain separated by a large insert (amino acids 236-373); and the C-terminus (C) are indicated. The 11 invariant residues and the two HRMs, within the eIF2 $\alpha$  kinase domain, that are absent in other Ser/Thr protein kinases are also indicated.

we constructed the HRI Q4 mutant, in which the entire kinase insert together with the N-terminal of HRI kinase subdomain V (11) was replaced by the corresponding amino acid sequence of mouse GCN2 (5). All the HRI constructs in pRSETB vector (11) were efficiently expressed in *E. coli* and the amounts of recombinant proteins, tested by Western blot, were similar (data not shown).

To assess the kinase activity of the HRI mutants, an *in vitro* kinase assay was performed in which bacterial extracts containing these mutants were tested for phosphorylation of exogenously added eIF2. Under these conditions, the extent of inhibition of eIF2 $\alpha$  kinase activity of the wild type and HRI mutants by heme was dependent upon the amount of HRI used.

To determine the role of the HRMs in the heme regulation of HRI we studied the effect of hemin on the eIF2 $\alpha$  kinase activity of three different HRI mutants, C409A/C550A,  $\Delta 8$ , and  $\Delta 8$ /C550A. For all of the mutants, eIF2 $\alpha$  kinase activity was similar to that of the wild type HRI. Furthermore, the eIF2 $\alpha$  kinase activity of HRI mutants was also hemin-sensitive (Fig. 2A). Interestingly, the extent of inhibition of HRI mutants by heme was similar to that of HRI wt at all hemin concentrations tested (Fig. 2B). The concentration of hemin required for 50% inhibition of eIF2 $\alpha$  kinase activity was about 0.3-0.5  $\mu$ M for wild type HRI, in good agreement with earlier studies (3, 18), and 0.3  $\mu$ M, 0.4  $\mu$ M and 0.7  $\mu$ M for C409A/C550A,  $\Delta 8$  and  $\Delta 8$ /C550A mutants, respectively. These results strongly suggest that the entire HRM1 and the cysteine residue in HRM2 have no apparent effect on the heme-responsiveness of HRI *in vitro*.

Similarly, to determine the role of both amino and carboxyl ends in the heme regulation of HRI, the inhibition by heme of the eIF2 $\alpha$  kinase activity of the two indicated HRI deletion mutants, also containing point mutations into the HRMs ( $\Delta 137$ /C409A/C550A and 138-580/C409A/C550A), were compared. In this case, the eIF2 $\alpha$  kinase activity of mutants was also inhibited by the same concentration range of hemin (Fig. 2A), although we obtained slightly different values in the hemin concentration required for their half-maximal inhibition (Fig. 2B). These results suggest that neither N- nor C-terminal domains are essential in the heme regulation of HRI. Finally, the mutant HRI Q4, in which the HRI kinase insert had been

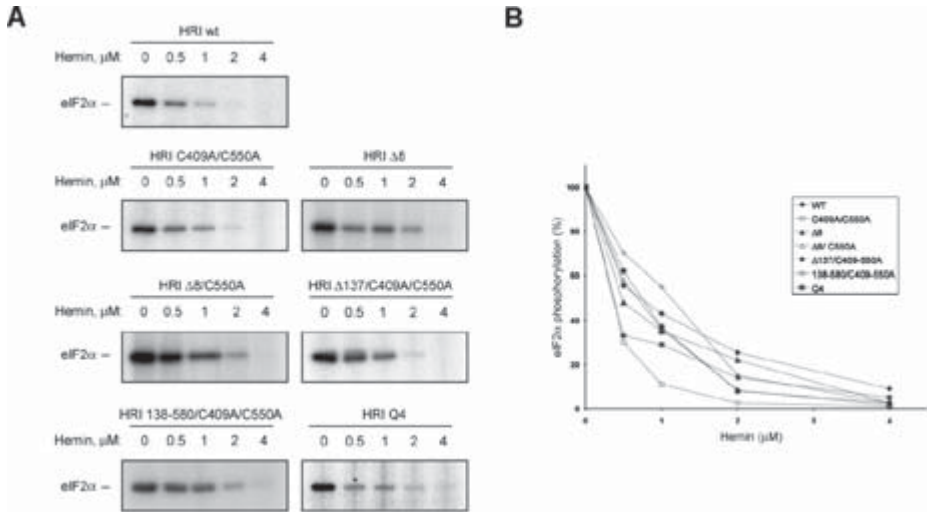


FIGURE 2. **A**, samples of recombinant HRI wt, as a control; HRI C409A/C550A; HRI Δ8; HRI Δ8/C550A; HRI Δ137/C409A/C550A; HRI 138-580-C409A/C550A; and HRI Q4 proteins were analyzed for their ability to phosphorylate purified rabbit reticulocyte eIF2, in the presence of increasing concentrations of hemin as indicated. Position of phosphorylated eIF2α is indicated. **B**, the phosphorylation of eIF2α was estimated by quantifying the corresponding band density of the autoradiograms. The intensity of the eIF2α band at zero concentration of hemin was defined as 100%. The figure shows a representative experiment of at least three independent experiments with very similar results.

replaced by the mouse GCN2 corresponding region, showed lower eIF2α kinase activity (Fig. 2A). Probably due to its low specific activity, HRI Q4 was more sensitive to inhibition by heme (0.4 μM for 50% inhibition) than that of wild type HRI (Fig. 2B). This result suggests that the kinase insert region, which does not show any significant homology with those of the other eIF2α kinases, may not be the important region for achieving the heme responsiveness of HRI. Altogether, our mutational analysis indicates that the heme regulatory region(s) are spread around the 12 conserved subdomains characteristic of all eukaryotic Ser/Thr protein kinases.

Because the kinase catalytic region of HRI was responsible for heme regulation, we tested whether the other eIF2α kinases, besides mammalian HRI, could be inhibited by hemin *in vitro*. To this end, we used purified eIF2α kinases from transfected HEK 293T cells:

mouse HRI (as positive control), mouse GCN2, human PKR, and *Drosophila* PERK. In order to achieve full activity of GCN2 and PKR, they were assayed in the presence of Sindbis virus RNA (20) and poly(I)·poly(C), respectively (Fig. 3A). Of great interest was the finding that both the autokinase and eIF2 $\alpha$  kinase activities of the affinity-purified recombinant eIF2 $\alpha$  kinases were inhibited by low

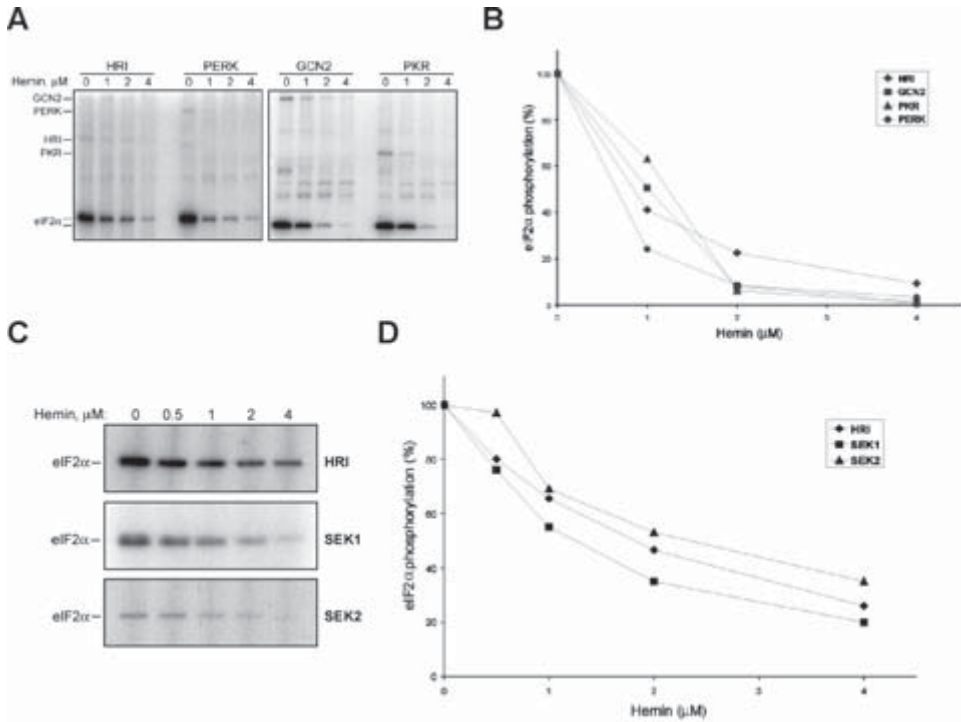


FIGURE 3. **A**, autokinase and eIF2 $\alpha$  kinase activities of distinct eIF2 $\alpha$  kinases are inhibited by hemin. All four eIF2 $\alpha$  kinases (mouse HRI and GCN2, human PKR and *Drosophila* PERK) were expressed in HEK 293T cells as Myc-His fusion proteins and purified by affinity chromatography. *In vitro* phosphorylation assays were performed in the absence or presence of the indicated increasing concentrations of hemin, as described under Material and Methods. The positions of phosphorylated HRI, GCN2, PKR, PERK and eIF2 $\alpha$  are indicated. **B**, eIF2 $\alpha$  phosphorylation was estimated by densitometric analysis as described for Fig. 2. **C**, eIF2 $\alpha$  kinase activity of both *S. pombe* eIF2 $\alpha$  kinases, SEK1 and SEK2, is inhibited by hemin. All three eIF2 $\alpha$  kinases (mouse HRI and *S. pombe* SEK1 and SEK2) were expressed in *E. coli*, as previously reported. *In vitro* phosphorylation assays were performed in the absence or presence of the indicated concentrations of hemin. **D**, eIF2 $\alpha$  phosphorylation was estimated and represented as in B.

concentrations of hemin (Fig. 3A). Moreover, the extent of inhibition of all of them by heme was similar to that of mouse HRI at all hemin concentrations tested (Fig. 3B). We therefore conclude that the kinase activities of different eIF2 $\alpha$  kinases are also regulated *in vitro* by hemin.

Moreover, the two novel eIF2 $\alpha$  kinases from *S. pombe* (SEK1/Hri1p and SEK2/Hri2p) were also heme-responsive *in vitro* (Fig. 3C). Again, the extent of the inhibition of SEK1 and SEK2 by heme was similar to that of mouse HRI at all concentrations tested (Fig. 3D). Altogether, our results indicate that the responsiveness to hemin *in vitro* is a common property of all the other eIF2 $\alpha$  kinases.

We were interested in ascertaining the possible specificity for the hemin effect reported here. In order to see if other protein kinases, in addition to eIF2 $\alpha$  kinases, were heme responsive, we tested the effect of hemin on the protein kinase activity of two other Ser/Thr protein kinases, CKII and  $\zeta$ PKC. The data presented in Fig. 4 demonstrated that the *in vitro* phosphorylation of either casein, by CKII, or MBP, by  $\zeta$ PKC, was not inhibited by the presence of hemin. We therefore conclude that the eIF2 $\alpha$  kinases, but not other serine-

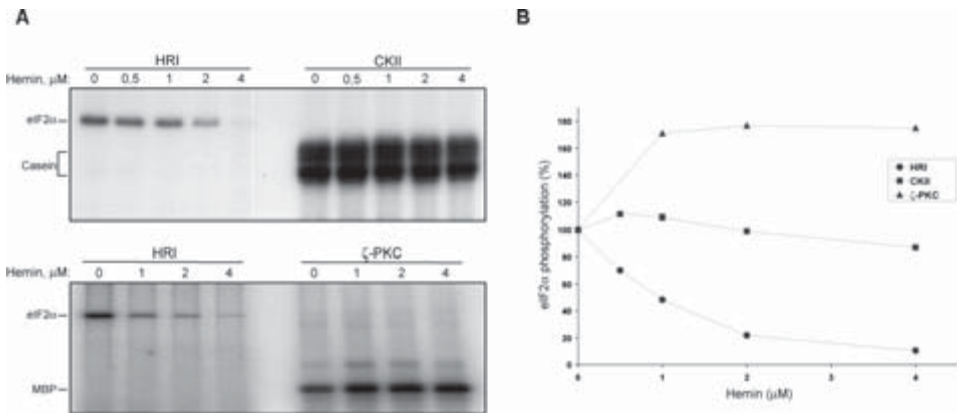


FIGURE 4. **A**, shown are the results from the *in vitro* phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by recombinant mouse HRI, as a control, of casein by purified casein kinase II, and of MBP by purified His-tagged  $\zeta$ PKC, in the absence or presence of the indicated concentrations of hemin. The positions of phosphorylated eIF2 $\alpha$ , casein and MBP are indicated. **B**, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , casein and MBP was estimated as described in Figure 2.



threonine protein kinases, are regulated *in vitro* by hemin, suggesting that the putative heme-regulatory motifs are shared by all members of the eIF2 $\alpha$  kinase family.

## DISCUSSION

The molecular mechanism(s) by which hemin regulates mammalian HRI has yet to be determined. Furthermore, the precise heme-binding domain responsible for rapid regulation of HRI by heme is not characterized. Some previous reports have suggested that purified HRI is a homodimer and a hemoprotein with two distinct heme-binding sites. Binding of heme to an N-terminal domain (amino acids 1-138) of HRI is stable and autonomous, whereas binding to a kinase-insertion domain (amino acids 241-406) is dynamic and may be responsible for the reversible heme regulation of HRI (18). It should be noted that this reported kinase-insertion domain contains not only the entire mouse kinase insert sequence unique to HRI but also includes the kinase subdomain V and the adjacent amino acids (LHIQMQLC), a highly conserved motif among eIF2 $\alpha$  kinases. Additionally, HRI is among six hemoproteins that have a putative heme regulatory motif (HRM) where Cys at position 2 seems to be essential (19). HRI contains two of these HRMs, which are not present in the other eIF2 $\alpha$  kinases. The data reported here indicate that the HRMs do not play an essential role in the heme-responsiveness of HRI. Thus, Cys-409 and Cys-550 were mutated individually to alanine and the entire HRM1 was deleted with no apparent effect on either the eIF2 $\alpha$  kinase activity or the heme responsiveness of the HRI mutants. Furthermore, two novel eIF2 $\alpha$  kinases from *S. pombe*, highly similar to HRI, show heme responsiveness *in vitro* although amino acid sequence analyses revealed that they lacked any of this HRM.

Comparison of the deduced amino acid sequences of mammalian HRI with the other eIF2 $\alpha$  kinases reveals the existence in HRI of three unique regions, very different in sequence and size, in addition to the two kinases lobes containing the 12 conserved catalytic subdomains characteristic of all eukaryotic Ser/Thr protein kinases. Thus, mouse HRI comprises these five domains (Fig. 1B): the amino

terminus, the first kinase lobe (catalytic subdomains I to IV), the kinase insert (amino acids 236-373), the second kinase lobe (catalytic subdomains V to XI) and the carboxyl terminus (11). The data reported here strongly suggest that the three unique regions in HRI (the N- and C-terminus and the kinase insert) are not involved in the regulation of HRI activity by heme. Furthermore, we report here that the kinase insert domain of mouse HRI is required for kinase activity but does not play a significant role in the heme regulation of HRI. Thus, we also observed that the HRI Q4 mutant, that contains the kinase insert domain of mouse GCN2 instead of its own domain, is still heme-regulated. These findings demonstrate that the binding domain responsible for the heme regulation of HRI is located within its two kinase lobes and, therefore, raise the possibility that some other eIF2 $\alpha$  kinases may also be sensitive to inhibition by heme.

To test this possibility, we attempted to determine whether members of the other known eIF2 $\alpha$  kinase subfamilies had the ability to be regulated by hemin *in vitro*. Here, we have shown that all recombinant mouse GCN2, *Drosophila* PERK and human PKR exhibit both the autokinase and the eIF2 $\alpha$  kinase activities *in vitro* and, strikingly, these two kinase activities are inhibited by low concentrations of hemin. Our results indicate that the heme binding to a still unknown but well conserved region, may block the binding of ATP and thus inhibit both the autokinase and the eIF2 $\alpha$  kinase activities of all known eIF2 $\alpha$  kinases *in vitro*.

By comparing the amino acid sequence of mouse HRI with all other known eIF2 $\alpha$  kinases (up to 20 members) we have found 11 invariant positions within the kinase domain that are absent in the majority of other Ser/Thr protein kinases. These conserved residues are as follows: R162, D189, Y229, W233, I380, Q381, C385, F447, G458, L462 and P569 (Fig. 1B). It is of particular interest that three of these residues (I380, Q381 and C385), uniquely conserved among eIF2 $\alpha$  kinases, are located in the kinase lobe that binds ATP. Thus, according to sequence alignment with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase (PKA-C $\alpha$ ) (15), and assuming that all Ser/Thr protein kinases fold into topologically similar three-dimensional core structures, it was predicted that the conserved sequence LHIQMLCE will form a very hydrophobic  $\beta$ -strand (b5) in the small kinase lobe and will connect the two lobes of the catalytic domain.

In addition, some residues of this motif help to anchor ATP by forming hydrogen bonds with either the adenine or the ribose ring (15). Moreover, previous results indicate that the cysteine residue in the HRM of six different hemoproteins is absolutely essential for binding to heme (19). It has been suggested that such cysteine serves the critical function of donating electrons to the iron atom of heme (19). Therefore, it is possible that these three amino acids (I380, Q381 and C385), the Cys-385 in particular, may be directly involved in heme binding, although the exact heme regulatory sites within the eIF2 $\alpha$  kinases remain to be determined.

Collectively, our results indicate that, although the known regulatory mechanisms of eIF2 $\alpha$  kinases *in vivo* are very different, all known eIF2 $\alpha$  kinases are regulated *in vitro* by heme. Thus, heme may represent a regulatory mechanism unique to eIF2 $\alpha$  kinases. On the other hand, heme has been shown to function as an effector molecule that can regulate many biological processes, including transcription, translation, protein translocation and erythroid differentiation. Also, heme plays key roles in oxygen sensing and utilization in all living organisms ranging from bacteria to humans (24). Our studies provide a new example of how heme may control the activity of a family of translational inhibitors and how a regulatory system may be conserved from yeast to mammals to control protein synthesis. Thus, the eIF2 $\alpha$  kinases may provide a feedback mechanism to coordinate the synthesis of some hemoproteins that are essential for the function of all aerobic cells, according to heme concentration in eukaryotic cells. When cells grow in a limiting supply of oxygen, the low concentration of heme synthesized would allow the activation of the eIF2 $\alpha$  kinases, and a low level of protein synthesis would result. In a more aerobic environment, heme would repress the eIF2 $\alpha$  kinases, eliciting full induction of protein synthesis.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emilio Itarte and Jorge Moscat for rat CKII and rat  $\zeta$ PKC, respectively. We thank E. Martínez-Salas and N. Pomar for critical reading of the manuscript. We also thank José Alcalde

for excellent technical assistance. This work was supported by DGICYT Grants PM98-0128 and BMC2002-03933 and by an institutional grant from the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».

## REFERENCES

- (1) DE HARO, C.; MÉNDEZ, R. and SANTOYO, J. (1996): The eIF-2 $\alpha$  kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 10: 1378-1387.
- (2) DEVER, T. E. (2002): Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* 108: 545-556.
- (3) LU, L.; HAN, A. P. and CHEN, J. J. (2001): Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7971-7980.
- (4) KAUFMAN, R. J. (2000): The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. in: *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., Eds), pp. 503-527, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (5) BERLANGA, J. J.; SANTOYO, J. and DE HARO, C. (1999): Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur. J. Biochem.* 265: 754-762.
- (6) HINNEBUSCH, A. G. (2000): Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosome. in: *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., Eds), pp. 185-243, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (7) DENG, J.; HARDING, H. P.; RAUGHT, B.; GINGRAS, A. C.; BERLANGA, J. J.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; RON, D. and SONENBERG, N. (2002): Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr. Biol.* 12: 1279-1286.
- (8) SHI, Y.; VATTEM, K. M.; SOOD, R.; AN, J.; LIANG, J.; STRAMM, L. and WEK, R. C. (1998): Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7499-7509.
- (9) HARDING, H. P.; ZHANG, Y. and RON, D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 397: 271-274.
- (10) ZHAN, K.; VATTEM, K. M.; BAUER, B. N.; DEVER, T. E.; CHEN, J. J. and WEK, R. C. (2002): Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7134-7146.
- (11) BERLANGA, J. J.; HERRERO, S. and DE HARO, C. (1998): Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase from mouse nonerythroid cells. *J. Biol. Chem.* 273: 32340-32346.

- (12) SANTOYO, J.; ALCALDE, J.; MÉNDEZ, R.; PULIDO, D. and DE HARO, C. (1997): Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2 $\alpha$  (eIF-2 $\alpha$ ) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology to yeast GCN2 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 12544-12550.
- (13) POMAR, N.; BERLANGA, J. J.; CAMPUZANO, S.; HERNÁNDEZ, G.; ELÍAS, M. and DE HARO, C. (2003): Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) kinase. *Eur. J. Biochem.* 270: 293-306.
- (14) HARDING, H. P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SHAPIRA, M. and RON, D. (2000): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6: 1099-1108.
- (15) HANKS, S. K. and HUNTER, T. (1995): The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576-596.
- (16) CAI, R. and WILLIAMS, B. R. (1998): Mutations in the double-stranded RNA-activated protein kinase insert region that uncouple catalysis from eIF2 $\alpha$  binding. *J. Biol. Chem.* 273: 11274-11280.
- (17) CHEFALO, P. J.; OH, J.; RAFIE-KOLPIN, M.; KAN, B. and CHEN, J. J. (1998): Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase purifies as a hemoprotein. *Eur. J. Biochem.* 258: 820-830.
- (18) RAFIE-KOLPIN, M.; CHEFALO, P. J.; HUSSAIN, Z.; HAHN, J.; UMA, S.; MATTS, R. L. and CHEN, J. J. (2000): Two heme-binding domains of heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$  kinase. N terminus and kinase insertion. *J. Biol. Chem.* 275: 5171-5178.
- (19) ZHANG, L. and GUARENTE, L. (1995): Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14: 313-320.
- (20) BERLANGA, J. J.; VENTOSO, I.; HARDING, H. P.; DENG, J.; RON, D.; SONENBERG, N.; CARRASCO, L. and DE HARO, C. (2006): Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* 25: 1730-1740.
- (21) BERRA, E.; DÍAZ-MECO, M. T.; LOZANO, J.; FRUTOS, S.; MUNICIO, M. M.; SÁNCHEZ, P.; SANZ, L. and MOSCAT, J. (1995): Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C  $\zeta$ . *EMBO J.* 14: 6157-6163.
- (22) MÉNDEZ, R. and DE HARO, C. (1994): Casein kinase II is implicated in the regulation of heme-controlled translation inhibitor of reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 269: 6170-6176.
- (23) LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- (24) PONKA, P. (1999): Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* 318: 241-256.



————— *Artículo original* —————

## **Protein processing in *Plasmodium falciparum*?**

Recibido el 28 de noviembre de 2006

ALMUDENA CROOKE, AZAR RADFAR, AMALIA DIEZ and  
JOSÉ M. BAUTISTA \*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV,  
Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria,  
Madrid (Spain)*

### **ABSTRACT**

The genomes from the organisms of the *Plasmodium* genus, the causative agents of human and animal malaria, are characterized by an extreme high A+T content and an associated abundant low complexity inserts within their proteins. The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (G6PD-6PGL) found in *Plasmodium* species has unique structural and bifunctional characteristics. Here, we report the expression analysis of *P. falciparum* G6PD-6PGL along the intraerythrocytic cycle by immunological analysis with antibodies raised against its N- and C- terminal domains. The pattern modification of band sizes at the different stages of parasite development suggest intracellular protein processing involving the cleavage of the native bifunctional form to produce two main fragments. *In vitro* RNA-mediated PfG6PD-6PGL gene silencing, studied along short-term parasite development also revealed the apparent intracellular protein modification dependent on the parasite stage. Fragment sizes were consistent with separating both catalytic functions of the enzyme. The proteolytic machinery underlying this specific PfG6PD-6PGL processing is still unknown in *P. falciparum* but suggests the existence of distinctive mechanisms in the parasite to deal with unique protein structures of essential function resulting from its genome evolution.

---

\* To whom correspondence should be addressed: José M. Bautista, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid (Spain).

Tel: + 34 91 394 3823. Fax +34 91 394 3824, e-mail: jmbau@vet.ucm.es

**Key words:** Malaria.—Protein processing.—Glucose-6-phosphate dehydrogenase.—Gene silencing.—dsRNA.

## RESUMEN

### ¿Procesamiento de proteínas en *Plasmodium falciparum*?

Los genomas de los organismos del género *Plasmodium*, agente causante de la malaria humana y animal, se caracterizan por un alto contenido en A+T e inserciones de baja complejidad en sus proteínas. La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-6-fosfogluconolactonasa (G6PD-6PGL) de las especies de *Plasmodium* posee unas características estructurales y bifuncionales únicas. En el presente trabajo analizamos la expresión de la G6PD-6PGL de *P. falciparum* a lo largo del ciclo intraeritrocítico mediante análisis inmunológico con anticuerpos frente a sus dominios N- y C- terminal. La modificación del tamaño del patrón de bandas en los diferentes estadios del desarrollo del parásito sugiere un procesamiento intracelular de la proteína que implicaría que la forma nativa bifuncional genera dos fragmentos principales. El silenciamiento *in vitro* del gen PfG6PD-6PGL, mediante ARN de interferencia, durante el desarrollo a corto plazo del parásito, también reveló la aparente modificación intracelular de la proteína dependiente del estadio de su ciclo vital. El tamaño de los fragmentos fue consistente con la separación de las dos funciones catalíticas de la enzima. Aunque en *P. falciparum* no se ha identificado la maquinaria proteolítica de este procesamiento específico de PfG6PD-6PGL, nuestros resultados sugieren la existencia de mecanismos especializados para el procesamiento intracelular de este tipo de proteínas de estructura única y de función esencial, y que han podido aparecer como consecuencia de la particular evolución de su genoma.

**Palabras clave:** Malaria.—Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.—Silenciamiento de genes.—ARN de interferencia.

## INTRODUCTION

*Plasmodium falciparum* is the causative agent of the most severe form of human malaria being responsible for the death of more than 1 million people a year (1). The efforts to control the illness have been focused on the chemotherapy, mosquito control and in the development of vaccines. Nowadays, the lack of an effective vaccine and the increasing parasite resistance to available drugs suggest the necessity to identify new targets that allow the development of new drugs and vaccines. Completion of *Plasmodium*



genome sequences (2-4) has provided a vast amount of molecular information. This, together with the transcriptome (5, 6) and proteomic analysis along the parasitic developmental stages (7) pursue a deep understanding of the peculiar parasite biology in the context of exploring new therapeutic and immunization strategies. Since 1993, different technologies of *P. falciparum* genetic manipulation have been developed as gene disruption by homologous recombination (8-13), antisense RNA (14, 15) and more recently, RNA interference that has been successfully applied to understand the *in vivo* functions of *P. falciparum* genes (16-18).

Genome comparison from lower eukaryotes have shown that *Plasmodium* proteins are notably longer in size than their respective orthologous genes. This is due to the extraordinary attribute of *Plasmodium* proteins that are hugely enriched in stretches biased toward 1-3 residues (mainly Asn, Lys, and Ile) due to the high A+T content (about 80% average). Due to this particular composition these stretches acquire low entropy or complexity (19). These regions are embedded into highly conserved domains that form globular structures with larger variety of residue composition with high entropy and complexity (19). Although many eukaryotes have also low complexity areas in nuclear proteins, transcription factors, and some cytoskeletal proteins, *Plasmodium* species display low complexity stretches in unique genes, not observed before in genomes from other organisms. In addition, these unusual regions even penetrate in independent functional domains with unpredictably length between 10 and 100 residues (20).

*P. falciparum* G6PD-6PGL is a bifunctional enzyme exclusive to *Plasmodium* species (21) that probably arose from the fusion of two genes in a common ancestor (22). The deduced protein has a subunit molecular mass of 107 kDa, in agreement with the tetramer molecular weight calculated by size exclusion chromatography (23). Its C-terminal half (residues 311-911) is clearly homologous to other described G6PDs (with glucose 6-phosphate dehydrogenase activity) though sequence similarity is interrupted by a 62 amino-acid stretch with no similarity found to date. It has been nevertheless experimentally shown that this 62 amino acid insertion is essential for the activity of the bifunctional enzyme (24). In contrast, the 310 amino-acid protein sequence of the amino

terminal region clearly differs from most eukaryotic and prokaryotic G6PDs, and shows 6-phosphogluconolactonase activity; thus G6PD-6PGL catalyses the first two stages of the pentose phosphate pathway (21). The occurrence of large insertion sequences that differ with respect to their homologous proteins in other species has been often observed in many gene products of *P. falciparum* and other *Plasmodium* species, but their structural functions and origins are unknown (24, 25). We have been interested to know whether the low complexity invasions of globular domains could have a role in regulating protein turnover along the parasitic cycle, and therefore, in the present paper, the unique bifunctional *P. falciparum* G6PD-6PGL protein was explored as a model gene to study dynamics of its protein processing along the intraerythrocytic cycle and under gene silencing conditions.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Parasite cultures and electroporation

*P. falciparum* strain 3D7 was grown and double synchronised using standard procedures (26,27). Parasites (ring stage 8-10% parasitaemia) were transfected by electroporation with 40 µg of dsRNA as described (8). The parasites transfected with dsRNA-G6PD or dsRNA-Rab5a were kept for 24 h in 75 cm<sup>2</sup> flasks. The growth and development of each transfection was monitored by Giemsa staining blood films.

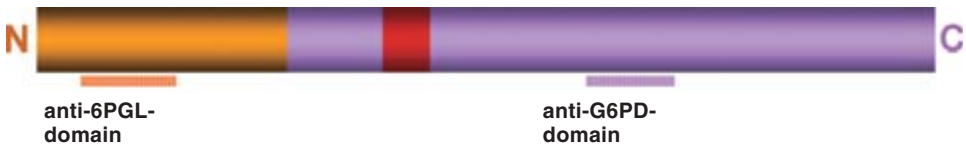
### dsRNA design

A 21 basepair dsRNA (sense: UACAUCAUGCACCAACGAAdTdT; antisense: UUCGUUGGUGCAUGAUGUAdTdT) was designed for the target sequence (UACAUCAUGCACCAACGAA) of the G6PD-6PGL gene, following Dharmacon siDESIGN Center criteria (<http://design.dharmacon.com/>). In addition, a dsRNA corresponding to the PfRab5a gene (GenBank<sup>TM</sup> accession number AE001399) (target sequence: UAUGCAAGUAUUGUCCAC; sense: UAUGCAAGUAUUGUCCACdTdT; antisense: GUGGGACAAUACUUGCAUAdTdT)

was also designed to use as control. All dsRNAs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA) in annealed and lyophilised form and were suspended in RNase-Dnase-free water before use.

## Immunodetection

Antibodies were raised against two different recombinant *P. falciparum* G6PD-6PDL polypeptides expressed in the vector pGEX (Amersham Biosciences), which contains the glutathione-S-transferase sequence upstream from the polylinker to produce a fusion protein with the insert. Sequences from ntG6PD-6PGL (AAYYICKEIYDKQQINKDGYVVIGLSGGRTPIDVYKNMCLIKDIKIDKSKL) and ctG6PD-6PGL (KILKSIPSIKLEDTIIGQYEKAENFKEDENNDDESCKNHS) (see Figure 1 for their location within the G6PD protein) were amplified and cloned into pGEX. Expression in *E. coli* was achieved following the manufacturer's instructions and the two glutathione-S-transferase/G6PD-6PDL fusion proteins were separately purified using a glutathione sepharose affinity column (Amersham Biosciences). Cleavage of the fusion protein by factor X and subsequent separation in SDS-PAGE provided pure protein for antibody production. Antibodies against ntG6PD-6PGL and ctG6PD-6PGL were raised separately in rabbits but used as a mixture in the Western blot analyses to increase the signal.



anti-6PGL domain (AAYYICKEIYDKQQINKDGYVVIGLSGGRTPIDVYKNMCLIKDIKIDKSKL)  
 anti-G6PD domain (KILKSIPSIKLEDTIIGQYEKAENFKEDENNDDESCKNHS)

FIGURE 1. **G6PD-6PGL protein and location of antibody reactivity.** Scheme showing primary structure of the G6PD-6PGL gene with two main functional domains, the low complexity stretch (black) and the sequences of the peptides corresponding to the two antibodies raised (see text).

For Western blot analyses, infected red blood cells (IRBCs) from a 10 ml-culture were suspended in 2 volumes of 0.2% saponin in PBS and incubated for 20 min at 37° C, to lyse the RBC membranes. The released parasites were pelleted at 10000 x g for 10 min and washed three times in cold PBS. The parasite pellet was solubilized in 100 µl of TTP (PBS containing 1% Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail, Complete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and incubated for 30 min at 4° C with frequent vortexing. Next, the soluble parasite fraction was frozen (at -70° C for 5 min) and thawed (at 37° C for 5 min) only once and centrifuged for 10 min at 10000 x g. 10 µg of total protein supernatant was boiled in 5x loading buffer and separated on 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes and probed with the above mentioned antibodies at 1/200 dilutions. Antibody binding was detected by incubation with secondary 1/5000 HRP-conjugated sheep anti-rabbit Ig Abs, followed by chemoluminescence detection using SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL). Bands were quantified using Quantity One® software (BioRad, Hercules, CA).

## RESULTS

### **PfG6PD-6PGL protein expression patterns across the intraerythrocytic cycle**

Expression patterns at the protein level were examined through immunodetection of parasite G6PD-6PGL using antibodies against N- and C- terminal separately and a mixture of both of them. Bands with different molecular weight were consistently observed in western blots. As shown in Figure 2, a 107 kDa band corresponding to the theoretical molecular mass of the deduced protein sequence was abundant mainly in mature stages and detected with both antibodies. Also two other abundant bands of 73 and 69 KDa were observed, predominantly in the mature parasite. Thus, the 73 kDa band, detected by the anti-6PGL domain antibody, has a size that includes the N-terminal domain with the expected 6PGL activity and the main low-complexity stretch between both domains. The 69 kDa band, detected by the anti-G6PD domain antibody, match with the

expected size of the G6PD domain. In addition, in the mature stages two other smaller bands were also detected: a 44 kDa band detected with the anti-6PGL domain and a 39 kDa band detected with the anti-G6PD domain, which could result from degradation of their corresponding 73 kDa and 69 kDa band, respectively.

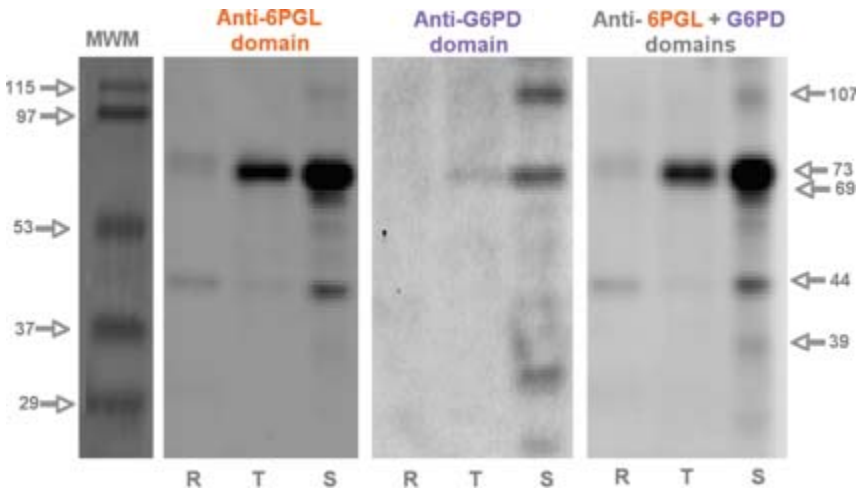


FIGURE 2. **G6PD-6PGL protein patterns across the intraerythrocytic cycle of *P. falciparum*.** Expression patterns at protein level were examined through immunodetection of the parasite G6PD-6PGL. Parasites harvested at the three main stages, rings (R), trophozoites (T) and Schizonts (S) were transferred and immunodeveloped with three different conditions using anti-6PGL domain, anti-G6PD domain, and a mixture of both of them.

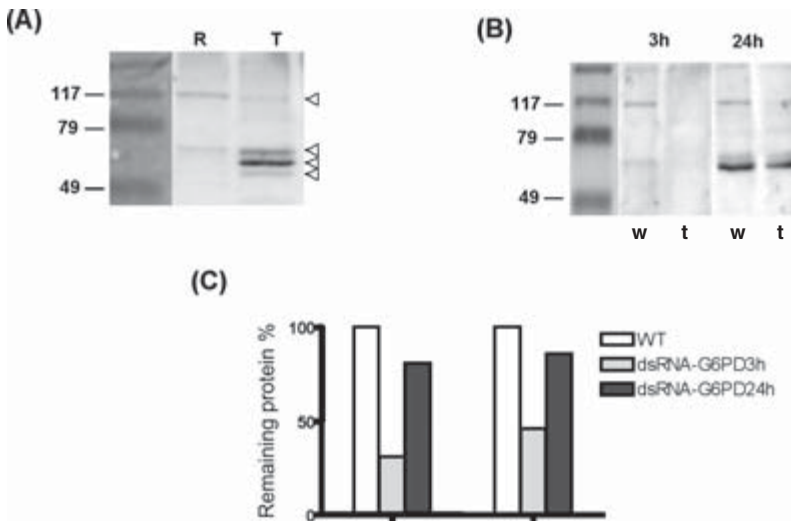
### dsRNA silencing of the PfG6PD-6PGL and expression pattern

In an attempt at silencing the G6PD-6PGL gene, erythrocytes infected with ring-stage *P. falciparum* 3D7 (pyrimethamine-sensitive clone) were electroporated with a dsRNA-G6PD duplex, RNase-free water and dsRNA-Rab5a (the last two as controls) as previously reported (18).

The G6PD-6PGL protein band pattern during the *P. falciparum* intraerythrocyte cycle, as revealed by immunodetection with both antibodies is shown in Figure 3A. In all stages, two main bands of different molecular weight were observed, a 107 kDa band

corresponding to the theoretical molecular mass of the deduced protein sequence and the 73 kDa band with 2 other subforms in the mature parasites.

Compared to the control, gene silencing by dsRNA reduced G6PD-6PGL immunoreactivity as observed in cultures at 3 and 24 h (Fig. 3B). Thus, as earlier as 3 h, a 54% and 69% reductions in the 73 kDa and 107 kDa bands, respectively, were observed (Fig. 3C). After 24 h, this effect started to diminish, and only 14% and 19% decreases in the two bands, respectively, were observed (Fig. 3C). These data confirm previous findings that silencing through dsRNA-G6PD instantly took place after 3 h of electroporation at the ring stage, with normal levels gradually restored at the trophozoite stage, 24 h post-transfection (18).



**FIGURE 3. Effect of dsRNA on parasite protein levels.** (A) Immunoblot analysis of wild-type synchronized 3D7 rings and trophozoites. The G6PD-6PGL protein band pattern immunodetected during the intraerythrocyte cycle of *P. falciparum* includes the 107, 73, 69 and 53 kDa bands labelled with arrows. (B) Immunoblot analysis of synchronized wild-type (w) and dsRNA-G6PD transfected (t) parasites (10  $\mu$ g of total protein per lane) at 3 and 24 h after electroporation. (C) Immunoblot quantification of synchronized wild-type and dsRNA-G6PD parasites. The 107 and 73 kDa bands signal detected were quantified by densitometry using a Fluor-S MultiImager and Quantity One quantitation software (Bio-Rad). Value for PfG6PD-6PGL in dsRNA-G6PD parasites is expressed as a percentage of control levels in wild-type parasites transfected with water. The positions of molecular mass standards are indicated (kD).

## DISCUSSION

The data presented above indicate that this unique bifunctional *Plasmodium* G6PD-6PGL protein varies in size depending on the parasite developmental stage. Thus, the 69 kDa band detected by the anti-G6PD domain antibody coincides with the expected size of the G6PD domain at the C-terminal, and the 73 kDa band identified by the anti-6PGL domain antibody could have a size that including the essential insertion (24) corresponds to the N-terminal of the protein with the 6PGL activity. Thus, it seems that the bifunctional protein could mature to render two different polypeptides with separate enzyme activities but sharing the essential insertion.

To assess specific biological gene function in the parasite, several systems for the functional analysis of *P. falciparum* genes have been developed, including gene silencing by antisense RNA (14, 18) or more recently, by RNA interference (16-18). Antisense RNA has been found in humans, mice, plants and protozoan parasites such as *P. falciparum*. The fact that endogenous antisense RNAs are widespread in *P. falciparum*, suggests that they could be a natural gene expression regulatory mechanism (28, 29). In our model, *P. falciparum* G6PD-6PGL was silenced *in vivo* through a dsRNA. Although mechanisms of RNAi silencing in many organisms are not well known, this technique has been used to study gene function in a great variety of organisms including other parasites (30). Despite the fact that, so far, the genes encoding the required RNAi machinery have not been detected in any of the currently available *Plasmodium* databases, RNAi silencing has been achieved in *Plasmodium* (16-18). Thus, it could be that the data reported for *Plasmodium*, as well as our results using dsRNA-G6PD, are the consequence of an antisense RNA rather than a direct RNAi effect. However, it is also true that, to date, 60% of the genes predicted for *P. falciparum* have no known homologs, and we have no clues as to their function (4).

The protein expression patterns examined by gene silencing showed that after 3 h of transfection, when most of the parasites are at the ring stage, the complete 107 kDa band predominates in both transfected and not transfected parasites. However, after 24 h of electroporation when the parasites were mainly at the trophozoite stage, the main band was the 73 kDa band. Again, this data suggest

protein size change across parasite life cycle by protein processing or by alternative splicing. To this respect, different sizes of mRNA G6PD-6PGL have been observed in parasites in the ring and trophozoite stages (31). Thus, there seems to be specific *P. falciparum* mechanisms for processing this mRNA, controlled by the parasite's development cycle, which could be unique or shared with other genes (32, 33). The 69 kDa band could coincide with the C-terminal end of the protein corresponding to G6PD activity in such a way that it would not show the N-terminal end that corresponds to the 6PGL activity. Based on the data shown, we can hypothesize a controlled pattern of PfG6PD-6PGL processing during parasite maturation as depicted in Figure 4.



FIGURE 4. **Hypothetical processing of G6PD-6PGL.** The protein product sizes observed by immunodetection analysis across the intraerythrocytic *P. falciparum* life cycle could be explained by two steps of controlled maturation of the protein to take apart, optimize and recycle, the two functional enzymatic activities in the parasite cell.

An independent role of the 6PGL function has been addressed, and although its 6-phosphogluconolactone substrate is highly unstable *in vitro*, some increase in the efficiency of the pathway may be evident (21,34). To this respect, the lactonase activity



shown by the bifunctional enzyme is ten times lower than that of the monofunctional domain 6PGL (21), demonstrating its low efficiency for 6-phosphogluconolactone hydrolysis. Moreover, from a structural standpoint, it has also been questioned whether the bifunctional protein is more efficient in producing NADPH than two separate enzymes (21). NADPH is also the co-substrate of *Plasmodium* glutathione reductase and thioredoxin reductase enzymes that protects against oxidative stress caused mainly by digestion of host cell haemoglobin at the late ring-early trophozoite stage (35). Thus, different NADPH efficiencies could be required at different developmental stages with particular specialization by the bifunctional protein (21). Another explanation of this apparent processing, is the genome economy shown by the small *Plasmodium* genome containing a proportionally high number of genes compared to similar genome sizes (36, 37). Several other unique bifunctional enzymes have been described in *Plasmodium* species (38-40) reflecting the parasite's rapid evolution in its constant fight to overcome host defence mechanisms.

### ACKNOWLEDGMENTS

A.C. was awarded a Predoctoral fellowship by the Comunidad de Madrid. This research was funded by grants PM1999-0049-CO2-01 and BIO2003-07179 from the Spanish MCYT.

### REFERENCES

- (1) SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y. and HAY, S. I. (2005): The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 434: 214-217.
- (2) GARDNER, M. J.; TETTELIN, H.; CARUCCI, D. J.; CUMMINGS, L. M.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SHALLOM, S.; MASON, T.; YU, K.; FUJII, C.; PEDERSON, J.; SHEN, K.; JING, J.; ASTON, C.; LAI, Z.; SCHWARTZ, D. C.; PERTEA, M.; SALZBERG, S.; ZHOU, L.; SUTTON, G. G.; CLAYTON, R.; WHITE, O.; SMITH, H. O.; FRASER, C. M.; HOFFMAN, S. L. and *et al.* (1998): Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 282: 1126-1132.
- (3) BOWMAN, S.; LAWSON, D.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C. M.; CRAIG, A.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; GWILLIAM,

- R.; HAMLIN, N.; HARRIS, D.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; HORROCKS, P.; JAGELS, K.; JASSAL, B.; KYES, S.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; MURPHY, L.; BARRELL, B. G. and *et al.* (1999): The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 400: 532-538.
- (4) GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R. W.; CARLTON, J. M.; PAIN, A.; NELSON, K. E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I. T.; JAMES, K.; EISEN, J. A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S. L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M. S.; NENE, V.; SHALLOM, S. J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B.; MARTIN, D. M.; FAIRLAMB, A. H.; FRAUNHOLZ, M. J.; ROOS, D. S.; RALPH, S. A.; MCFADDEN, G. I.; CUMMINGS, L. M.; SUBRAMANIAN, G. M.; MUNGALL, C.; VENTER, J. C.; CARUCCI, D. J.; HOFFMAN, S. L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. M. and BARRELL, B. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419: 498-511.
  - (5) BOZDECH, Z.; ZHU, J.; JOACHIMIAK, M. P.; COHEN, F. E.; PULLIAM, B. and DERISI, J. L. (2003): Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol*. 4: R9.
  - (6) LE ROCH, K. G.; ZHOU, Y.; BLAIR, P. L.; GRAINGER, M.; MOCH, J. K.; HAYNES, J. D.; DE LA VEGA, P.; HOLDER, A. A.; BATALOV, S.; CARUCCI, D. J. and WINZELER, E. A. (2003): Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 301: 1503-1508.
  - (7) LASONDER, E.; ISHIHAMA, Y.; ANDERSEN, J. S.; VERMUNT, A. M.; PAIN, A.; SAUERWEIN, R. W.; ELING, W. M.; HALL, N.; WATERS, A. P.; STUNNENBERG, H. G. and MANN, M. (2002): Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*. 419: 537-542.
  - (8) WU, Y.; SIFRI, C. D.; LEI, H. H.; SU, X. Z. and WELLEMS, T. E. (1995): Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 973-977.
  - (9) CRABB, B. S. and COWMAN, A. F. (1996): Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 7289-7294.
  - (10) CRABB, B. S.; TRIGLIA, T.; WATERKEYN, J. G. and COWMAN, A. F. (1997): Stable transgene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 90: 131-144.
  - (11) LOBO, C. A.; FUJIOKA, H.; AIKAWA, M. and KUMAR, N. (1999): Disruption of the Pfg27 locus by homologous recombination leads to loss of the sexual phenotype in *P. falciparum*. *Mol Cell*. 3: 793-798.
  - (12) OMARA-OPYENE, A. L.; MOURA, P. A.; SULSONA, C. R.; BONILLA, J. A.; YOWELL, C. A.; FUJIOKA, H.; FIDOCK, D. A. and DAME, J. B. (2004): Genetic disruption of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. *J Biol Chem*. 279: 54088-54096.
  - (13) SIJWALI, P. S. and ROSENTHAL, P. J. (2004): Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 4384-4389.

- (14) GARDINER, D. L.; HOLT, D. C.; THOMAS, E. A.; KEMP, D. J. and TRENHOLME, K. R. (2000): Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA. *Mol Biochem Parasitol.* 110: 33-41.
- (15) NOONPAKDEE, W.; POTHIKASIKORN, J.; NIMITSANTIWONG, W. and WILAIRAT, P. (2003): Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation in vitro by antisense oligodeoxynucleotides against malarial topoisomerase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 302: 659-664.
- (16) McROBERT, L. and McCONKEY, G. A. (2002): RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 119: 273-278.
- (17) KUMAR, R.; ADAMS, B.; OLDENBURG, A.; MUSIYENKO, A. and BARIK, S. (2002): Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar J.* 1: 5.
- (18) CROOKE, A.; DIEZ, A.; MASON, P. J. and BAUTISTA, J. M. (2006): Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. *Febs J.* 273: 1537-1546.
- (19) WOOTTON, J. C. (1994): Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. *Comput Chem.* 18: 269-285.
- (20) ARAVIND, L.; IYER, L. M.; WELLEMS, T. E. and MILLER, L. H. (2003): *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell.* 115: 771-785.
- (21) CLARKE, J. L.; SCOPES, D. A.; SODEINDE, O. and MASON, P. J. (2001): Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. A novel bifunctional enzyme in malaria parasites. *Eur J Biochem.* 268: 2013-2019.
- (22) SCOPES, D. A.; BAUTISTA, J. M.; VULLIAMY, T. J. and MASON, P. J. (1997): *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-the N-terminal portion is homologous to a predicted protein encoded near to G6PD in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol.* 23: 847-848.
- (23) KURDI-HAIDAR, B. and LUZZATTO, L. (1990): Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 41: 83-91.
- (24) CLARKE, J. L.; SODEINDE, O. and MASON, P. J. (2003): A unique insertion in *Plasmodium berghei* glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: evolutionary and functional studies. *Mol Biochem Parasitol.* 127: 1-8.
- (25) PIZZI, E. and FRONTALI, C. (2001): Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum* proteins. *Genome Res.* 11: 218-229.
- (26) TRAGER, W. and JENSEN, J. B. (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193: 673-675.
- (27) LAMBROS, C. and VANDERBERG, J. P. (1979): Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 65: 418-420.
- (28) GUNASEKERA, A. M.; PATANKAR, S.; SCHUG, J.; EISEN, G.; KISSINGER, J.; ROOS, D. and WIRTH, D. F. (2004): Widespread distribution of antisense transcripts in the *Plasmodium falciparum* genome. *Mol Biochem Parasitol.* 136: 35-42.
- (29) MILITELLO, K. T.; PATEL, V.; CHESSLER, A. D.; FISHER, J. K.; KASPER, J. M.; GUNASEKERA, A. and WIRTH, D. F. (2005): RNA polymerase II synthesizes antisense RNA in *Plasmodium falciparum*. *RNA.* 11: 365-370.

- (30) ULLU, E.; TSCHUDI, C. and CHAKRABORTY, T. (2004): RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 6: 509-519.
- (31) CAPPADORO, M.; GIRIBALDI, G.; O'BRIEN, E.; TURRINI, F.; MANNU, F.; ULLIERS, D.; SIMULA, G.; LUZZATTO, L. and ARESE, P. (1998): Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood.* 92: 2527-2534.
- (32) SINGH, N.; PREISER, P.; RENIA, L.; BALU, B.; BARNWELL, J.; BLAIR, P.; JARRA, W.; VOZA, T.; LANDAU, I. and ADAMS, J. H. (2004): Conservation and developmental control of alternative splicing in maelbl among malaria parasites. *J Mol Biol.* 343: 589-599.
- (33) MULLER, I. B.; WALTER, R. D. and WRENGER, C. (2005): Structural metal dependency of the arginase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem.* 386: 117-126.
- (34) MICLET, E.; STOVEN, V.; MICHELS, P. A.; OPPERDOES, F. R.; LALLEMAND, J. Y. and DUFFIEUX, F. (2001): NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *J Biol Chem.* 276: 34840-34846.
- (35) BOZDECH, Z. and GINSBURG, H. (2004): Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*-data mining of the transcriptome. *Malar J.* 3: 23.
- (36) ENRIGHT, A. J. and OUZOUNIS, C. A. (2001): Functional associations of proteins in entire genomes by means of exhaustive detection of gene fusions. *Genome Biol.* 2, research0034.1-0034.7.
- (37) VEITIA, R. A. (2002): Rosetta Stone proteins: «chance and necessity»? *Genome Biol.* 3, interactions1001.1-1001.3.
- (38) BZIK, D. J.; LI, W. B.; HORII, T. and INSELBURG, J. (1987): Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 8360-8364.
- (39) PASHLEY, T. V.; VOLPE, F.; PUDNEY, M.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. and DELVES, C. J. (1997): Isolation and molecular characterization of the bifunctional hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86: 37-47.
- (40) MULLER, S.; DA'DARA, A.; LUERSEN, K.; WRENGER, C.; DAS GUPTA, R.; MADHUBALA, R. and WALTER, R. D. (2000): In the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 275: 8097-8102.

## **INFORMACIÓN ACADÉMICA**

## Sesiones Científicas

### 23 de noviembre

A las 19 horas, Mesa Redonda Homenaje a Ramón y Cajal. Coordina la Excm. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal. Intervienen: el Excmo. Señor Don Jesús Ávila de Grado, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales: «La visión de futuro de Cajal», y la Profesora M. Ángela Nieto, Profesora de investigación del CSIC: «De cómo los embriones ayudaron a Cajal y nos ayudan hoy a entender la salud y la enfermedad».

### 30 de noviembre

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente el Doctor Alfio Piva, Director del Instituto de Biodiversidad de Costa Rica. Fue presentado por el Académico de Número Profesor Doctor Don Julio Rodríguez Villanueva. Asistió al Acto la Ministra Consejera de Costa Rica.

### 14 de diciembre

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente el Doctor José M.<sup>a</sup> Sánchez Montero, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense, quien leyó su discurso: «Biotecnología blanca e Industria Farmacéutica». Fue presentado por el Académico de Número Excmo. Señor Don Antonio L. Doadrio Villarejo.

## Noticias

El Profesor Domínguez Gil-Hurlé, Académico de Número, tomó posesión de su plaza de Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Salamanca, el 20 de noviembre, con su discurso de ingreso: «Farmacocinética y seguridad del paciente». Contestó al discurso el Académico de Número, Catedrático de Hematología y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, Profesor Jesús San Miguel Izquierdo.

\* \* \*

El 20 de noviembre el Doctor Joan Guinovart, Académico de Número de nuestra Real Academia, leyó su discurso como Académico Correspondiente en la Academia de Ciencias del Instituto de Chile. La respuesta al discurso de recepción fue realizada por el Profesor Rafael Vicuña.

\* \* \*

El 21 de noviembre publicamos el libro homenaje del que fuera Director y Presidente de Honor de nuestra Academia, Profesor Doctor Don Ángel Santos Ruiz: «En Memoria de un Maestro: Ángel Santos Ruiz».

\* \* \*

El Doctor Joan Guinovart, Académico de Número de nuestra Real Academia, impartió la conferencia «Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular» en el Congreso de la Sociedad de Biología celebrado en Pucón (Chile) del 22 al 25 de noviembre. Asimismo, el 27 de noviembre participó en un Seminario sobre innovación celebrado en la Universidad de Valdivia (Chile).

\* \* \*

Los Académicos de Número, Profesores Doctores Antonio Doadrio López y M.<sup>a</sup> Carmen Francés Causapé han sido galardonados con la

Medalla de Honor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense.

\* \* \*

A la Doctora Ana Pascual Leone-Pascual, Académica de Número, le ha sido concedida la Medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Dicha Medalla le fue impuesta el 8 de diciembre en los Actos Conmemorativos de la Patrona de Farmacia.

\* \* \*

Recibimos la grata noticia de la inminente publicación del Diccionario Terminológico de Ciencias Farmacéuticas Bilingüe Español-Inglés.

\* \* \*

El día 13 de diciembre el Señor Doctor Don Albino García Sacristán, Académico de Número de nuestra Real Academia, tomó posesión de la plaza correspondiente a la Medalla número 50 adscrita a la Sección de Veterinaria de la Real Academia de Doctores de España. Pronunció el discurso sobre el tema «Bienestar animal, bienestar humano». Fue contestado en nombre de la Real Academia de Doctores de España por el Señor Doctor Don Félix Pérez y Pérez.

\* \* \*

El 14 de diciembre fue elegida nueva Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, y reelegido en su cargo de Bibliotecario, el Excmo. Señor Don Antonio Martínez Fernández.

\* \* \*

El 15 de diciembre, le fue impuesta al Profesor Salvador Rivas Martínez, Académico de Número, la Encomienda con Placa de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio, por la Ministra de Educación y



Ciencia, Doña Mercedes Cabrera Calvo-Sotelo, en un emotivo acto celebrado en el Salón Goya del Ministerio.

\* \* \*

El 17 de diciembre, el Doctor Jesús Larralde Berrio, Académico de Número de nuestra Real Academia, ha sido premiado en los IV Premios COF Navarra, entregados por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Navarra. El Colegio de Farmacéuticos distingue al Doctor Larralde como «farmacéutico con una trayectoria profesional significativa». El acto estuvo presidido por la Consejera de Salud del Gobierno de Navarra, María Kutz Peironcely.

\* \* \*

El 21 de diciembre, el Profesor Daniel Sánchez Mata, Académico Correspondiente de nuestra Corporación, accede, por unanimidad de la Comisión de Acceso, a la Cátedra de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

\* \* \*

El 21 de diciembre fue elegido nuevo Académico de Número, medalla número 13, el Profesor Doctor César Nombela Cano, Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.

\* \* \*

Nuestro Académico Correspondiente, Doctor José Cardús Aguilar falleció el pasado 29 de diciembre.

## **Juan Manuel Reol Tejada tomó posesión como Académico de Honor en la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina**

El día 9 de noviembre, el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia de España, tomó posesión de su plaza como Académico de Honor en la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina, con sede en Buenos Aires.

A esta ilustre Academia han pertenecido y pertenecen eminentes científicos y personalidades, entre los que se encuentra el Profesor Bernardo Hussay, Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1947, por sus descubrimientos sobre el papel de la hipófisis en el metabolismo de los carbohidratos y la diabetes. En la actualidad el Profesor Modesto Rubio ostenta la presidencia de dicha Academia.

Al acto asistieron numerosas personalidades del mundo cultural y científico, así como representantes de instituciones españolas y argentinas, entre ellas mencionar el Consejero de Cultura de la Embajada Española, el Decano de la Facultad de Farmacia de Buenos Aires, el Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y el Presidente y la Secretaria del Centro Buralés de Buenos Aires.

Presentó al Doctor Reol el Profesor Sanahuja, quien fue Presidente de la Academia Argentina hasta 2005, haciendo expresa mención del buen hacer de nuestro Presidente y su especial interés y preocupación en dar una nueva dimensión a lo que deben de ser las funciones de la Academia en la actualidad.

El Doctor Reol dejó constancia de los estrechos lazos que unen a nuestra Academia con las de los países de Iberoamérica, y muy especialmente la de Argentina, comprometiéndose con dos objetivos primordiales. Primero, que en seguimiento de la Declaración de Valparaíso, la Real Academia Nacional de Farmacia de España tiene la oportunidad histórica de impulsar definitivamente el movimiento académico iberoamericano, con ocasión de la celebración del II Encuentro en Madrid, en la primavera de 2007. Al éxito de este Encuentro, el Doctor Reol manifestó que estamos dedicando nues-

tros mejores afanes. Segundo, que en próximas ediciones del «Diccionario de Términos Farmacéuticos Español-Inglés», que se presentará en fecha próxima en la Academia, deben participar nuestras Academias hermanas hispanoamericanas.

El discurso del Doctor Reol caló hondo entre los miembros de la Academia Argentina y el Profesor Modesto C. Rubio, Presidente de la Academia Argentina, expresó ese sentir general en una cariñosa y elogiosa carta dirigida al Doctor Reol, y de la que se extraen los párrafos más significativos:

«Creo que todo el Claustro Académico ha quedado encantado con vuestra conferencia, por el tema en sí y por la claridad de los conceptos vertidos. La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica considera todo un privilegio contarle entre sus Académicos de Honor.

Creo que las excelentes relaciones logradas entre nuestras Academias deberán fructificar en los próximos años y la reunión de Academias del próximo año es un excelente punto para continuar nuestro acercamiento. Creo que las definiciones de objetivos comunes y herramientas para encarar los mismos devendrán en un enriquecimiento de la Farmacia como ciencia y como profesión».

*Comentario al libro homenaje: «En Memoria de un Maestro: Ángel Santos Ruiz», en honor del Profesor Doctor Don Ángel Santos Ruiz, quien fuera Director y Presidente de Honor de nuestra Academia*

## **Ángel Santos Ruiz Padre**

MARÍA DEL ROSARIO SANTOS-RUIZ DÍAZ

*Doctora en Farmacia*

En primer lugar, quiero agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia y a su Junta de Gobierno, por haber tenido la iniciativa de dedicar un libro a la memoria de padre, y de modo especial a la Doctora María Cascales, coordinadora de este volumen.

El agradecimiento tiene que hacerse extensivo a todos los que participan con sus trabajos en este libro y que a buen seguro realzarán todos los aspectos profesionales de padre: farmacéutico, catedrático, investigador, académico, médico, director técnico en la industria farmacéutica, etc., pues fue la suya una larga vida en el tiempo y profunda en el trabajo, lo que le permitió tener una dedicación tan amplia a tan diversos aspectos de la «FARMACIA», con mayúsculas, fundamento y eje de toda su vida profesional.

Por mi parte, considero que tengo que referirme a su lado humano, pues si larga y profunda fue su vida profesional, su conducta humana fue en todo momento un ejemplo para todos nosotros, un recuerdo inolvidable y que, aún pecando de inmodestia, y a pesar de que sé que a él no le gustaría, hoy me permito destacar.

Empalmando con lo que antes señalaba, me referiré, en primer lugar, al trabajo, al que dedicaba la gran mayoría de su tiempo; más que recuerdos, son vivencias imborrables de mi niñez: por la mañana se iba muy temprano a la Facultad de la que regresaba a última hora para realizar una comida frugal y casi sin descanso, salir para los laboratorios donde trabajaba para la industria; así años y años; ¿qué hacía en uno y otro lugar?, bien, eso es lo que entiendo que otros colaboradores de este libro nos dirán.

Con el paso del tiempo no decayó su espíritu de trabajo y ya jubilado, en sus últimos años, continuaba estudiando y escribiendo y por supuesto asistiendo asiduamente a las RR.AA. de las que era miembro.

Mi impresión es que tuvo una vida de total entrega al trabajo, desarrollando sin descanso los dones naturales —memoria, entendimiento y voluntad— que Dios graciosamente la había concedido en no pequeño grado.

Su intensa entrega al trabajo no le impedía dedicar tiempo —sin duda fruto del orden que presidía todo su quehacer— a los tres aspectos humanos que considero más destacables de su vida: el familiar, el religioso y el deportivo.

Mamá y nosotros éramos para él el centro de su vida. Lo que más quería. Lo que más le preocupaba.

En lo que a nosotros respecta, aparte del cariño y el ejemplo que en todo momento nos dio, fue a nuestra educación, a los estudios y a los idiomas a los que le dio mayor importancia; los cuatro hermanos hicimos carreras universitarias y a todos nos envió frecuentemente al extranjero; fue algo natural, no impuesto, pero tampoco discutido: en ningún momento de mi vida me planteé «dejar de estudiar», como era bastante normal en chicas de aquella época; era una obligación que año tras año se iba realizando casi sin darme cuenta.

Igual me ocurrió con la Tesis Doctoral —magníficamente dirigida por María Cascales a la que aún hoy día me une una íntima amistad—, con los primeros trabajos y con el definitivo en el Centro Nacional de Farmacología de Majadahonda, donde estuve varios años y del que pedí la excedencia al nacer mis hijas, a cuyo cuidado y educación aún hoy estoy dedicada.

Padre, aparte del ambiente de estudio existente en casa, siempre me animó y estimuló para estudiar, para presentarme y obtener las oposiciones y quizá, sin darme excesiva cuenta, «controló» toda mi época de formación.

No descubro nada nuevo si recojo aquí que padre fue un hombre profundamente religioso: desde pequeño en su familia y particular-

mente desde que en sus años universitarios conoció al hoy San José María Escrivá de Balaguer y le conquistó para la causa del Opus Dei, padre fue una persona practicante de su religión católica, pero no un practicante para el «exterior», sino íntimamente practicante con unas convicciones inquebrantables y unas exigencias consigo mismo difícilmente reconocibles.

Tuve la suerte de acompañarle de manera muy cercana durante los últimos años de su vida y fue precisamente en esos años cuando despojado de todo «ropaje» humano más le conocí, más profundicé en su corazón y más transparente se me mostró y como consecuencia de ello, cuando realmente aprecié su talla, sus virtudes, su justicia, su equilibrio, su humildad, su control de sí mismo...

Sin duda es la ceguera de amor de hija lo que me hace decir esas cosas, y espero se me perdone, pero me gustaría poder expresarme correctamente para exponer justa y verdaderamente cómo era padre para que quedara memoria de ello en este «su» libro.

Practicaba el deporte: diariamente paseaba durante bastantes minutos; unos tres días a la semana, nadaba. Entiendo que encontraba en esta actividad el descanso y la recuperación que su vida intelectual le requería. Era sobrio y puntual en sus horarios, particularmente en su horario de comidas y sueño; era difícil sacarle de su rutina diaria.

Pero padre no era la suma de los distintos «aspectos» que he expuesto: por un lado familiar, deportista por otro, más allá religioso, y siempre trabajador; no; era un hombre que, como es lógico, reunía en sí todos estos aspectos; particularmente a mí me llamaba la atención, o al menos así lo creo, la existencia de un denominador común que unía todo ello y era la oración, todo lo ofrecía, el trabajo era oración para él —la dedicación íntegra a lo que hacía, el trabajo bien hecho, el no perder el tiempo, el aceptar los resultados y los contratiempos, etc.—. La familia era oración para él —alegrías y penas, las reuniones que tanto le gustaban, etc.—; seguro que el deporte también lo era y lo mismo podíamos decir de otras facetas de su vida, y del conjunto surgió un «todo» armonioso, un todo cercano, un todo maravilloso, como fue su vida, como fue padre...

Y de nuevo se me perdone..., pero se me pidió decir lo que me saliera del corazón, como al principio señalaba, y es lo que me sale; ¿defectos? Muchos sin duda; si el tener un fuerte carácter es defecto, si la exigencia con los demás —y consigo mismo el primero—, es defecto, si la rectitud llevada a la máxima expresión es defecto, tuvo muchos; pero que los digan otros, no yo, que soy su hija.

En resumen, que puedo afirmar que tuve un padre en toda la extensión de la palabra, ejemplo permanente en todas las facetas de la vida.





## **ÍNDICES DEL AÑO 2006**

- I. **ÍNDICE DE AUTORES**
- II. **ÍNDICE DE MATERIAS**

## Índice de autores

- ALCARAZ VARÓ, E. Aproximación al lenguaje de la Farmacia. **Pág. 343**
- ALONSO, I. Véase HERRERO, S. **Pág. 611**
- ALONSO, J. R. Derechos de los animales *versus* investigación biológica. **Pág. 83**
- ALONSO BEATO, M. T. Véase LADERO ÁLVAREZ, M. **Pág. 321\***
- AMORES-SÁNCHEZ, M. I. Véase MARTÍNEZ POVEDA, B. **Pág. 583**
- AVENDAÑO, C. Perspectiva de las reacciones de metástasis. El Premio Nobel de Química del año 2005. **Pág. 107**
- ÁVILA DE GRADO, J. La visión de futuro de Cajal. **Pág. 649**
- BAUTISTA, J. M. Véase CROOKE, A. **Pág. 629**
- BERLANGA, J. J. Véase HERRERO, S. **Pág. 611**
- BRAÑA, M. F.; CACHO, M.; GUI-SADO, C. Sulfonamida: el grupo mágico. **Pág. 317**
- BRAVO, I. G. Véase DE LA TORRE, M. F. **Pág. 463**
- CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. Derechos de los animales *versus* investigación biológica. **Pág. 69**
- CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. Gripe aviar: Situación actual. **Pág. 301**
- CACHO, M. Véase BRAÑA, M. F. **Pág. 317**
- CASAS, J. Véase MADRIGAL, P. **Pág. 599**
- COSTAS, E. Véase LÓPEZ-RODAS, V. **Pág. 391**
- CROOKE, A.; RADFAR, A.; DÍEZ, A.; BAUTISTA, J. M. Protein processing in *Plasmodium falciparum*? **Pág. 629**
- CUBELOS, B.; GIMÉNEZ, C.; ZAFRA, F. Hipótesis glutamatergica de la esquizofrenia: mecanismos moleculares del transporte de glicina en las sinapsis glutamatergicas. **Pág. 5**
- DAHMAN, Y.; MARCUELLO, A.; MONTIEL-SOXA, F. J.; MONTOYA, J.; DÍEZ-SÁNCHEZ, C.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J.; RUIZ-PESINA, E. Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies. **Pág. 37**
- DE FELIPE ANTÓN, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; LUCAS SÁNCHEZ, M. M.; FEDOROVA, E.; GOLVANO HERRERO, M. P.; GON-

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

- ZÁLEZ SAMA, A.; GUSCH PEREIRA, L.; DE LORENZO CARRETERO, C.; DE MARÍA DE LAS HERAS, N.; POZUELO GUANCHE, J. M.; PUEYO DABAD, J. J.; VIVO RODRÍGUEZ, A. Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*. **Pág. 423**
- DE HARO, C. Véase HERRERO, S. **Pág. 611**
- DE LA ROSA JORGE, M. C. Véase MOSSO ROMEO, M. A. **Pág. 285\***
- DE LA TORRE, M. F.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V.; REGLERO, A.; BRAVO, I. G. Spectrophotometric characterisation of the Cu(II):PPI system: implementation as a method for measuring pyrophosphate (PPI) in solution. **Pág. 463**
- DE LORENZO CARRETERO, C. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- DE MARÍA DE LAS HERAS, N. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- DE PRÁDENA LOBÓN, J. M. Véase TORIJA ISASA, M. E. **Pág. 259\***
- DIEZ, A. Véase CROOKE, A. **Pág. 629**
- DÍEZ-SÁNCHEZ, C. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- DOADRIO, A. L. Véase MADRIGAL, P. **Pág. 599**
- DOADRIO VILLAREJO, A. L. Ecotoxicología y acción toxicológica del plomo. **Pág. 409**
- ESTELLER, M. Véase LÓPEZ DE SILANES. **Pág. 563**
- FEDOROVA, E. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V. Véase DE LA TORRE, M. F. **Pág. 463**
- FERNÁNDEZ PASCUAL, M. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- FERRÁNDIZ, N. Véase GÓMEZ-CASARES, M. T. **Pág. 27**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Véase MARTÍN HERNÁNDEZ, D. **Pág. 165**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Véase VILLANÚA FUNGAIRIÑO, L. **Pág. 241\***
- GALVÁN RAMÍREZ, Y. Véase MANTERO SÁENZ, F. J. **Pág. 305\***
- GARCÍA MATA, M. Véase TORIJA ISASA, M. E. **Pág. 259\***
- GIMÉNEZ, C. Véase CUBELOS, B. **Pág. 5**
- GIRÁLDEZ DÁVILA, A. Derecho de los animales *versus* investigación biológica. Planteamiento conceptual. **Pág. 75**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

- GOLVANO HERRERO, M. P. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- GÓMEZ-CASARES, M. T.; VAQUÉ, J. P.; LEMES, A.; MOLERO, T.; FERRÁNDIZ, N.; LEÓN, J. Antiapoptotic proteins Bcl2 nad BclX do not protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-mediated growth arrest. **Pág. 27**
- GONZÁLEZ, P. Véase MADRIGAL, P. **Pág. 599**
- GONZÁLEZ DE POSADA, F. Einstein: 100 años de Relatividad. Ideas fundamentales para las Ciencias Farmacéuticas. **Pág. 49**
- GONZÁLEZ IGLESIAS, J. Véase LADERO ÁLVAREZ, M. **Pág. 321\***
- GONZÁLEZ SAMA, A. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- GUISADO, C. Véase BRAÑA, M. F. **Pág. 317**
- GUSCH PEREIRA, L. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- HERRERO, S.; BERLANGA, J. S.; ALONSO, I.; DE HARO, C. Heme responsiveness *in vitro* is a common feature shared by the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase family. **Pág. 611**
- HERVÁS-PÉREZ, J. P.; SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; LÓPEZ-CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida. **Pág. 443**
- JIMÉNEZ, R. Véase MONTURIOL, F. **Pág. 381\***
- LACADENA CALERO, J. R. Los Premios Nobel 2005 de Fisiología o Medicina y de Química. **Pág. 105**
- LADERO ÁLVAREZ, M.; LUENGO UGIDOS, M. A.; SANTOS BOBILLO, M. T.; GONZÁLEZ IGLESIAS, J.; ALONSO BEATO, M. T.; SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M. E. Vegetación del entorno del Balneario de Cervantes, Santa Cruz de Mudela (Ciudad Real). **Pág. 321\***
- LEMES, A. Véase GÓMEZ-CASARES, M. T. **Pág. 27**
- LEÓN, J. Véase GÓMEZ-CASARES, M. T. **Pág. 27**
- LÓPEZ-CABARCOS, E. Véase HERVÁS-PÉREZ, J. P. **Pág. 443**
- LÓPEZ DE SILANES, I.; ESTELLER, M. Aberrant mRNA stability regulation in human diseases. **Pág. 563**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

- LÓPEZ-GARCÍA, R. Véase MARTÍN-HERNÁNDEZ, D. **Pág. 165**
- LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- LÓPEZ-RODAS, V.; MANEIRO, E.; MARTÍNEZ, J.; NAVARRRO, M.; COSTAS, E. Harmful algal blooms, red tides and human health: diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer. **Pág. 391**
- LÓPEZ-RUIZ, B. Véase HÉRVAS-PÉREZ, J. P. **Pág. 443**
- LUCAS SÁNCHEZ, M. M. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- LUENGO UGIDOS, M. A. Véase LADERO ÁLVAREZ, M. **Pág. 321\***
- MADRIGAL, P.; DOADRIO, A. L.; GONZÁLEZ, P.; CASAS, J. Vanadium *in vivo* interaction with cefatoxime. **Pág. 599**
- MANEIRO, E. Véase LÓPEZ-RODAS, V. **Pág. 391**
- MANTERO SÁENZ, F. J.; GALVÁN RAMÍREZ, Y. Climatología del Baleario Cervantes. **Pág. 305\***
- MARCUELLO, A. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- MARTÍN HERNÁNDEZ, D.; LÓPEZ GARCÍA, R.; FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. **Pág. 165**
- MARTÍNEZ, J. Véase LÓPEZ-RODAS, V. **Pág. 391**
- MARTÍNEZ POVEDA, B.; AMORES-SÁNCHEZ, M. I.; RODRÍGUEZ QUESADA, A.; MEDINA, M. A. El hipérico: una fuente de compuestos bioactivos con un amplio espectro de acción. **Pág. 583**
- MEDINA, M. A. Véase MARTÍNEZ POVEDA, B. **Pág. 583**
- MIRAS PORTUGAL, M. T. Receptores de feromonas de mamíferos: supervivencia y sexualidad. **Pág. 489**
- MIRAS PORTUGAL, M. T. Homenaje a Ramón y Cajal en el centenario de la concesión del premio Nobel. **Pág. 643**
- MOLERO, T. Véase GÓMEZ-CASARES, M. T. **Pág. 27**
- MONTIEL-SOXA, F. J. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- MONTOYA, J. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- MONTURIOL, F.; JIMÉNEZ, R. Los suelos del término municipal de Santa Cruz de Mudela. **Pág. 381\***
- MOSSO ROMEO, M. A.; SÁNCHEZ BELTRÁN, M. C.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C.; DE LA ROSA JORGE, M. C. Microbiología de los ma-

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Baleario Cervantes (Ciudad Real)».

- nantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. **Pág. 285\***
- NAVARRO, M. Véase LÓPEZ-RODAS, V. **Pág. 391**
- NIETO, A. De cómo los embriones ayudaron a Cajal y nos ayudan hoy a entender la salud y la enfermedad. **Pág. 655**
- ORTIZ MELÓN, J. M. La diversidad funcional de proteína fosfatasa-1 y el papel de nuevas subunidades reguladoras. **Pág. 283**
- ORZÁEZ VILLANUEVA, M. T. Véase TORIJA ISASA, M. E. **Pág. 259\***
- PALOMARES LÓPEZ, J.; POZUELO CUERVO, M. Análisis de la radiactividad en aguas del Balneario Cervantes. **Pág. 277\***
- PAJARES GARCÍA, J. M. Descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su impacto en las enfermedades gastro-duodenales. Premio Nobel 2005, merecido aunque retrasado. **Pág. 139**
- PINTOR, J. New perspectives in ocular pharmacology: nucleotides as therapeutic agents. **Pág. 519**
- PINUAGA ESPEJEL, J. I.; RAMÍREZ ORTEGA, A. Geología, Hidrogeología y Protección del Balneario Cervantes de Santa Cruz de Mudela (Ciudad Real). **Pág. 369\***
- POZUELO CUERVO, M. Véase PALOMARES LÓPEZ, J. **Pág. 277\***
- POZUELO GUANCHE, J. M. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- PUEYO DABAD, J. J. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- RADFAR, A. Véase CROOKE, A. **Pág. 629**
- RAMÍREZ ORTEGA, A. Véase PINUAGA ESPEJEL, J. I. **Pág. 369\***
- REGLERO, A. Véase DE LA TORRE, M. F. **Pág. 463**
- RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C. Véase MOSSO ROMEO, M. C. **Pág. 285\***
- RODRÍGUEZ QUESADA, A. Véase MARTÍNEZ POVEDA, B. **Pág. 583**
- RUIZ-PESINI, E. Véase DAHMANY, Y. **Pág. 37**
- SAN MARTÍN BACAICOA, J.; VALERO CASTEJÓN, A. Acción terapéutica de las aguas del Balneario Cervantes. **Pág. 399\***
- SÁNCHEZ BELTRÁN, M. C. Véase MOSSO ROMEO, M. Z. **Pág. 285\***

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

- SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M. Véase HERVÁS-PÉREZ, J. P. **Pág. 443**
- SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M. E. Véase LADERO ÁLVAREZ, M. **Pág. 321\***
- SANTOS BOBILLO, M. T. Véase LADERO ÁLVAREZ, M. **Pág. 321\***
- SAPAG-HAGAR, M. La evolución y el ascenso bioquímico-molecular del hombre: del Big Ban a la conciencia valórica. **Pág. 235**
- TENORIO SANZ, M. D. Véase TORIJA ISASA, M. E. **Pág. 259\***
- TORIJA ISASA, M. E.; GARCÍA MATA, M.; ORZÁEZ VILLANUEVA, M. T.; TENORIO SANZ, M. D.; DE PRÁDENA LOBÓN, J. M. Análisis físico-químico de las aguas de los manantiales del Balneario Cervantes. **Pág. 259\***
- VALERO CASTEJÓN, A. Véase SAN MARTÍN BACAICOA, J. **Pág. 399\***
- VAQUÉ, J. P. Véase GÓMEZ-CASARES, M. T. **Pág. 27**
- VILLANÚA FUNGAIRIÑO, L.: FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. El Balneario Cervantes (Santa Cruz de Mudela). Historia y Generalidades. **Pág. 241\***
- VIVO RODRÍGUEZ, A. Véase DE FELIPE ANTÓN, M. R. **Pág. 423**
- ZAFRA, F. Véase CUBELOS, B. **Pág. 5**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

## Índice alfabético de materias

- Agua minero-medicinal. **Pág. 241\***
- Aguas mineromedicinales. **Págs. 259\*, 285\*, 399\***
- Aldehído oxidasa. **Pág. 423**
- Análisis físico-químico. **Pág. 259\***
- Angiogénesis. **Pág. 583**
- Animales. **Pág. 83**
- Antidepresivo. **Pág. 583**
- Antitumoral. **Pág. 583**
- ARN de interferencia. **Pág. 629**
- Aspectos éticos. **Pág. 69**
- Balneario Cervantes. **Págs. 241\*, 259\*, 285\***
- Balnearios. **Pág. 399\***
- Balneoterapia. **Pág. 399\***
- Barrera de resistencia a la difusión de oxígeno. **Pág. 423**
- BclX. **Pág. 27**
- Bcl2. **Pág. 27**
- Bioclimatología. **Pág. 305\***
- Biología. **Pág. 49**
- Bulbo olfativo accesorio. **Pág. 489**
- Canales TRPC2. **Pág. 489**
- Cáncer. **Pág. 563**
- Carbenos metálicos. **Pág. 107**
- Cefotaxima. **Pág. 599**
- Cervantes. **Pág. 321\***
- Cicatrización corneal. **Pág. 519**
- Ciudad Real. **Pág. 321\***
- CML. **Pág. 27**
- Cobre. **Pág. 463**
- Colorantes. **Pág. 317**
- Confort. **Pág. 305\***
- Contaminación. **Pág. 409**
- Control de la traducción. **Pág. 611**
- Derechos de los animales. **Pág. 75**
- Diacilglicerol. **Pág. 489**
- Diacilglicerol quinasa. **Pág. 489**
- Diadenosina polifosfato. **Pág. 519**
- Dinamicidad. **Pág. 49**
- Dinoflagelados. **Pág. 391**
- DNA mitocondrial. **Pág. 37**
- Dominio regulador de hemina. **Pág. 611**
- Dominios PDZ. **Pág. 5**
- DSP. **Pág. 391**
- eIF2 $\alpha$  quinasas. **Pág. 611**
- Einstein. **Pág. 49**
- Electrodo enzimático. **Pág. 443**
- Elementos enriquecidos en AU (ARE). **Pág. 563**
- Emergencia. **Pág. 49**
- Emulsión concentrada. **Pág. 443**
- Enfermedad de Alzheimer. **Pág. 563**
- España. **Pág. 321\***
- Espectro de absorción. **Pág. 463**
- Espectroscopía. **Pág. 463**
- Estructura. **Pág. 49**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».



- Experimentación. **Pág. 83**  
 Factores y procesos formadores. **Pág. 381\***  
 Farmacia. **Págs. 49, 343**  
 Farmacocinética. **Pág. 599**  
 Farmacodinamia. **Pág. 599**  
 Feromonas. **Pág. 489**  
 Fijación biológica de nitrógeno. **Pág. 423**  
 Física. **Pág. 49**  
 Fitotosiología. **Pág. 321\***  
 Fosforilación oxidativa. **Pág. 37**  
 Fotoactivador. **Pág. 583**  
 Galactosa oxidasa. **Pág. 443**  
 Geología. **Pág. 369\***  
 Glaucoma. **Pág. 519**  
 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. **Pág. 629**  
 Gripe aviar. **Pág. 301**  
 HA. **Pág. 301**  
 HABs. **Pág. 391**  
 Haplogrupos. **Pág. 37**  
*Helicobacter pylori*. **Pág. 139**  
*Helicobacter pylori* gastritis. **Pág. 139**  
*Helicobacter pylori* úlcera péptica. **Pág. 139**  
 Hemaglutinina. **Pág. 301**  
 Hidrogeología. **Pág. 369\***  
 Hierba de San Juan. **Pág. 583**  
 Hiperforina. **Pág. 583**  
 Hipericina. **Pág. 583**  
 Historia. **Pág. 317**  
 HPLC. **Pág. 599**  
 Humanos. **Pág. 37**  
 Imatinib. **Pág. 27**  
 Inflamación. **Pág. 563**  
 Influenza aviar. **Pág. 301**  
 Interacción proteína-proteína. **Pág. 5**  
 Investigación. **Págs. 75, 83**  
 Investigación biológica y de medicamentos. **Pág. 69**  
 K562. **Pág. 27**  
 Leghemoglobina. **Pág. 423**  
 Lenguaje. **Pág. 343**  
 Lenguajes profesionales. **Pág. 343**  
 Lexicografía y Lexicografía técnica. **Pág. 343**  
 Lipocalinas. **Pág. 489**  
 Lupino. **Pág. 423**  
 Malaria. **Pág. 629**  
 Manantiales bicarbonatados. **Pág. 285\***  
 MAPKinasas. **Pág. 423**  
 Marshall-Warren Premio Nobel. **Pág. 139**  
 Memoria Anual de Secretaría. Año 2005. **Pág. 198**  
 Metátesis. **Pág. 107**  
 Microbiología. **Pág. 285\***  
 Micropartículas. **Pág. 443**  
 Moduladores. **Pág. 283**  
 Necrológica de A. Portolés Alonso. **Pág. 165**  
 Necrológica de L. Villanúa Fungairiño. **Pág. 433\***  
 NMDAR. **Pág. 5**  
 Ojo seco. **Pág. 519**  
 Órgano vomeronasal. **Pág. 489**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

- Período de semidesintegración. **Pág. 277\***
- Pirofosfato. **Pág. 463**
- Plain English Campaign*. **Pág. 343**
- Plomo. **Pág. 409**
- Polímeros. **Pág. 107**
- Portolés Alonso, Antonio. **Pág. 165**
- PP1. **Pág. 283**
- Premios Nobel. **Pág. 107**
- Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2005. **Pág. 139**
- Premio Nobel de Medicina. **Pág. 139**
- Pre-mRNA. **Pág. 283**
- Presión intraocular. **Pág. 519**
- Procesamiento. **Pág. 283**
- Proceso de infección. **Pág. 423**
- Protección. **Pág. 369\***
- Proteínas de unión a ARE (AUBPs). **Pág. 563**
- Proteínas de unión a ARN. **Pág. 563**
- Química bioinorgánica. **Pág. 463**
- Quinasa regulada por hemina. **Pág. 611**
- Radiactividad. **Pág. 277\***
- Radionucleido. **Pág. 277\***
- Reacomodo. **Pág. 107**
- Receptores de nucleótidos. **Pág. 519**
- Receptores vomeronasales. **Pág. 489**
- Regulación génica post-transcripcional. **Pág. 563**
- Regulación de oxígeno. **Pág. 423**
- Relación litologías y suelos. **Pág. 381\***
- Relatividad. **Pág. 49**
- Respectividad. **Pág. 49**
- Responsabilidad social. **Pág. 83**
- Riesgo de cáncer. **Pág. 391**
- Runge. **Pág. 317**
- Salud. **Pág. 83**
- Salvarsan. **Pág. 317**
- Series radiactivas. **Pág. 277\***
- Silenciamiento de genes. **Pág. 629**
- SIPP1. **Pág. 283**
- Suelos. **Pág. 381\***
- Sulfamidas. **Pág. 317**
- Talasemia. **Pág. 563**
- Tráfico intracelular. **Pág. 5**
- Temperatura efectiva. **Pág. 305\***
- Toxicidad. **Pág. 409**
- Toxinas marinas. **Pág. 391**
- Uso actual y potencial de los suelos. **Pág. 381\***
- Uso de animales. **Pág. 69**
- Vanadio. **Pág. 599**
- Variabilidad. **Pág. 37**
- Vegetación. **Pág. 321\***
- Virus H5N1. **Pág. 301**
- V1R. **Pág. 489**
- V2R. **Pág. 489**

---

\* Correspondiente al número extraordinario: «Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)».

## RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

### 1. Publicaciones Periódicas

#### 1.1. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Tomo I, Año 1932, núms. 1-4

Tomo II, Año 1933, núms. 1-4

Tomo III, Año 1934, núms. 1-4

Tomo IV, Año 1935, núms. 1-4

Tomo V, Año 1936, núms. 1-4

2.<sup>a</sup> Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, núms. 1-6

2.<sup>a</sup> Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, núms. 1-6

2.<sup>a</sup> Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, núms. 1-6

Año IX, 1943, núms. 1-6

Año X, 1944, núms. 1-6

Año XI, 1945, núms. 1-4

Año XII, 1946, núms. 1-4

Año XIII, 1947, núms. 1-6

Año XIV, 1948, núms. 1-6

Año XV, 1949, núms. 1-6

Año XVI, 1950, núms. 1-6

Año XVII, 1951, núms. 1-6

Año XVIII, 1952, núms. 1-6

Año XIX, 1953, núms. 1-6

Año XX, 1954, núms. 1-6

Año XXI, 1955, núms. 1-6

Año XXII, 1956, núms. 1-6

Año XXIII, 1957, núms. 1-6

Año XXIV, 1958, núms. 1-6

Año XXV, 1959, núms. 1-6

Volumen XXVI, Año 1960, núms. 1-6

Volumen XXVII, Año 1961, núms. 1-6

Volumen XXVIII, Año 1962, núms. 1-6

Volumen XXIX, Año 1963, núms. 1-6

Volumen XXX, Año 1964, núms. 1-6  
Volumen XXXI, Año 1965, núms. 1-6  
Volumen XXXII, Año 1966, núms. 1-6  
Volumen XXXIII, Año 1967, núms. 1-4  
Volumen XXXIV, Año 1968, núms. 1-4  
Volumen XXXV, Año 1969, núms. 1-4  
Volumen XXXVI, Año 1970, núms. 1-4  
Volumen XXXVII, Año 1971, núms. 1-4  
Volumen XXXVIII, Año 1972, núms. 1-4  
Volumen XXXIX, Año 1973, núms. 1-4  
Volumen XL, Año 1974, núms. 1-4  
Volumen XLI, Año 1975, núms. 1-4  
Volumen XLII, Año 1976, núms. 1-4  
Volumen XLIII, Año 1977, núms. 1-4  
Volumen XLIV, Año 1978, núms. 1-4  
Volumen XLV, Año 1979, núms. 1-4  
Volumen XLVI, Año 1980, núms. 1-4  
Volumen XLVII, Año 1981, núms. 1-4  
Volumen XLVIII, Año 1982, núms. 1-4  
Volumen XLIX, Año 1983, núms. 1-4  
Volumen L, Año 1984, núms. 1-4  
Volumen LI, Año 1985, núms. 1-4  
Volumen LII, Año 1986, núms. 1-4  
Volumen LIII, Año 1987, núms. 1-4  
Volumen LIV, Año 1988, núms. 1-4  
Volumen LV, Año 1989, núms. 1-4  
Volumen LVI, Año 1990, núms. 1-4  
Volumen LVII, Año 1991, núms. 1-4  
Volumen LVIII, Año 1992, núms. 1-4  
Volumen LIX, Año 1993, núms. 1-4  
Volumen LX, Año 1994, núms. 1-4 y apéndice  
Volumen LXI, Año 1995, núms. 1-4 y apéndice  
Volumen LXII, Año 1996, núms. 1-4  
Volumen LXIII, Año 1997, núms. 1-4  
Volumen LXIV, Año 1998, núms. 1-4  
Volumen LXV, Año 1999, núms. 1-4 y extraordinario  
Volumen LXVI, Año 2000, núms. 1-4  
Volumen LXVII, Año 2001, núms. 1-4 y extraordinario  
Volumen LXVIII, Año 2002, núms. 1-4 y extraordinario

Volumen LXIX, Año 2003, núms. 1-4 y extraordinario  
Volumen LXX, Año 2004, núms. 1-4 y extraordinario  
Volumen LXXI, Año 2005, núms. 1-4  
Volumen LXXII, Año 2006, núms. 1-4 y extraordinario

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado núm. 2, Año 1977, Vol. XLIII; núms. 1 y 2, Año 1978, Vol. XLIII; número extraordinario, Año 2002, Vol. LXVIII.

## 1.2. *Anuarios*

- Anuario núm. 1, Año 1948
- Anuario núm. 2, Año 1949
- Anuario núm. 3, Año 1950
- Anuario núm. 4, Año 1951
- Anuario núm. 5, Año 1952
- Anuario núm. 6, Año 1953
- Anuario núm. 7, Año 1954
- Anuario núm. 8, Año 1955
- Anuario núm. 9, Año 1956
- Anuario núm. 10, Año 1957
- Anuario núm. 11, Año 1958
- Anuario núm. 12, Año 1959
- Anuario núm. 13, Año 1960
- Anuario núm. 14, Año 1961
- Anuario núm. 15, Año 1962
- Anuario núm. 16, Año 1963
- Anuario núm. 17, Año 1964
- Anuario núm. 18, Año 1965
- Anuario núm. 19, Año 1966
- Anuario núm. 20, Año 1967
- Anuario núm. 21, Año 1968
- Anuario núm. 22, Año 1969
- Anuario núm. 23, Año 1970
- Anuario núm. 24, Año 1971
- Anuario núm. 25, Año 1972
- Anuario núm. 26, Año 1973
- Anuario núm. 27, Año 1974

- Anuario núm. 28, Año 1975
- Anuario núm. 29, Año 1976
- Anuario núm. 30, Año 1977
- Anuario núm. 31, Año 1978
- Anuario núm. 32, Año 1979
- Anuario núm. 33, Año 1980
- Anuario núm. 34, Año 1981
- Anuario núm. 35, Año 1982
- Anuario núm. 36, Año 1983
- Anuario núm. 37, Año 1984
- Anuario núm. 38, Año 1985
- Anuario núm. 39, Año 1986
- Anuario núm. 40, Año 1987
- Anuario núm. 41, Año 1988
- Anuario núm. 42, Año 1989
- Anuario núm. 43, Año 1990
- Anuario núm. 44, Año 1991
- Anuario núm. 45, Año 1992
- Anuario núm. 46, Año 1993
- Anuario núm. 47, Año 1995
- Anuario núm. 48, Año 1996
- Anuario núm. 49, Año 1997
- Anuario núm. 50, Año 1998
- Anuario núm. 51, Año 1999
- Anuario núm. 52, Año 2000
- Anuario núm. 53, Año 2001
- Anuario núm. 54, Año 2002
- Anuario núm. 55, Año 2003.
- Anuario núm. 56, Año 2004.
- Anuario núm. 57, Año 2005.
- Anuario núm. 58, Año 2006.

Agotados núms. 1 al 27 (1948-1974); núm. 31 (1978); núm. 33 (1980);  
núm. 52 (1999).

## 2. Monografías

### 2.1. *Monografías de Aguas Mineromedicinales*

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975
Corconte (Agotada)	1976
Ledesma (Agotada)	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición) (Agotada)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafert	1995
Hervideros de Cofrentes	1998
Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada (Agotada)	2002
Balneario de Jaraba (Agotada)	2004
Balneario de Cervantes	2006

### 2.2. *Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas*

— Diseño de Medicamentos. Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994.

Coordinador: Doctor Arturo Mosqueira Toribio.

- Proliferación celular y cáncer. Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994.  
Coordinadores: Doctora María Cascales y Doctor Julio Rodríguez Villanueva.
- Autoinmunidad. Algunos aspectos básicos y clínicos. Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996.  
Coordinador: Doctor Antonio Portolés Alonso.
- Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.  
Coordinadora: Doctora María Cascales Angosto.
- Los residuos y sus riesgos para la salud. Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJİ FARMA, CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1998.  
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
- Alimentos y Salud, 2000.  
Coordinador: Doctor Bernabé Sanz Pérez.
- Salud, Educación y Energía. Recursos cualificados para el Siglo XXI. Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2001.  
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
- Proliferación celular y cáncer 2000. Publicada en colaboración de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, 2001.  
Coordinadora: Doctora María Cascales Angosto.
- Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca, 2001.  
Coordinador: Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
- La salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre de 2001), 2002.  
Coordinador: Doctor León Villanúa Fungairiño.
- Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento, 2003.  
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Doctor Pedro García Barreno.



- Temas escogidos de Seguridad Alimentaria, 2003.  
Coordinadores: Doctor Bernabé Sanz Pérez y Doctor Manuel Domínguez Carmona.
- Citocromo P450, 2004.  
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto y Doctora M.<sup>a</sup> José Gómez Lechón.
- Nuevos Avances en Medicamentos, 2004.  
Coordinadores: Doctora M.<sup>a</sup> Carmen Avendaño y Doctor Juan Tarmargo Menéndez.
- Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo, 2005.  
Coordinador: Doctor Manuel Domínguez Carmona.
- Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos, 2005.  
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctora M.<sup>a</sup> José Gómez-Lechón y Doctor José E. O'Connor Blasco.
- Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías, 2005.  
Coordinadora: Doctora Ana María Pascual-Leone Pascual.
- Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.  
Coordinadores: Doctora María Vallet Regí y Doctor Antonio Luis Doadrio Villarejo.
- Enfermedades metabólicas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID, Fundación Ramón Areces y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.  
Coordinadores: Doctor Federico Mayor Zaragoza y Doctora María Cascales Angosto.
- Influenza aviar y gripe humana de origen aviario, 2006.  
Coordinador: Doctor Bernabé Sanz Pérez.

### 2.3. *Otras Monografías*

- Sesión Científica en homenaje al Excmo. Señor Don Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989 (Agotado).

- Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.
- Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.
- Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa. En prensa.
- Ayer y Hoy de las Academias. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El Genoma Humano. Ciencia y Ética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Toxicología Ambiental. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Farmacocinética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patentes y Biopatentes. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Parasitismo y Desarrollo. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patogenia de Iones Metálicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Uso actual de las plantas medicinales cultivadas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El uso ilegítimo de los agentes químicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El SIDA. Un reto a la Ciencia y a la Sociedad. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Investigación y siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- Prescripción, Dispensación y Evidencia Científica (Medicina basada en la evidencia). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.

- Las Especialidades Farmacéuticas Genéricas y los Precios de Referencia. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
- Genómica y Farmacogenómica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- La Universidad de hoy y los Farmacéuticos de mañana. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- Infección por VIH y SIDA. Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- Farmacoeconomía e Investigación de Resultados en la Salud Principios y Práctica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.  
Coordinador: Doctor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Doctor Javier Soto Álvarez.
- Sesión Extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera.  
Coordinador: Antonio Portolés Alonso (separata del núm. 2 de Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia), 2002.
- Modificadores de la respuesta biológica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
- Autocuidado de la Salud. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia.  
Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP), 2003.
- Transferencias y coordinación farmacéutica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
- Investigación y Siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.

- Síndrome agudo respiratorio grave y gripe aviar. Publicada en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina, 2004.
- Mesa Redonda. Regeneración hepática. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.

### 3. Facsímiles

- Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica de Pedro Gutiérrez Bueno (Madrid, 1815). Prologado por la Doctora M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé, 1994.
- Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico y medicinales virtudes. De Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por la Doctora M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé, 1995.
- Concordia Aromatariorum Caesaraugstanensium DDLIII. Prologada por la Doctora M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
- Edición facsímil de los Discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera, 2002.
- Edición facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles. Por el Excmo. Señor Don Rafael Roldán y Guerrero. Tomo I. Presentación por el Doctor Don Antonio Portolés Alonso y prologado por la Doctora M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé, 2003.

### 4. Sesiones necrológicas

- Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle, 1992.
- Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo, 1992.
- Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
- Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona, 1996.
- Excmo. Señor Don Octavio Carpena Artés, 1997.
- Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo, 1998.
- Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí, 1998.

- Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño, 2000.
- Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio, 2000.
- Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro, 2000.
- Excmo. Señor Don Manuel Martel San Gil, 2001.
- Excmo. Señor Don Manuel Gómez-Serranillos, 2004.
- Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero, 2005.
- Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo, 2005.
- Excmo. Señor Don León Villanúa Fungairiño, 2005.
- Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez, 2005.
- Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez, 2005.
- Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz, 2005.
- Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, 2005.

## 5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso

- La vida *in vitro*. Por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
- El alma de la Farmacia. Por el Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
- La contaminación del ambiente y su influencia en la vida. Por el Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
- Los medicamentos de ayer y de hoy. Por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1972.
- La química médica ante el futuro. Por el Excmo. Señor Don Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.
- La revolución farmacéutica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Jáuregui González. Año 1974.
- Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas. Por el Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.
- El problema de la creación de nuevos medicamentos. Por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
- El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.
- Momentos estelares del pensamiento científico. Por el Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle. Año 1978.
- Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos. Por el Excmo. Señor Don Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.

- La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. Por el Excmo. Señor Don Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
- Consideraciones históricas sobre la porcelana. Por el Excmo. Señor Don Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
- Anecdótico microbiano. Por el Excmo. Señor Don Lorenzo Vilas López. Año 1982.
- Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
- Técnica y Medio Ambiente. Por el Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
- Álbaro Alonso Barba. Un metalurgo del siglo de Oro. Por el Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
- La ultracentrifuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular. Por el Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
- La Biosfera y el Hombre. Por el Excmo. Señor Don Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
- Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico. Por el Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo. Año 1988.
- Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor. Por el Excmo. Señor Don Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
- El grave peligro de pensar. Por el Excmo. Señor Don Román de Vicente Jordana. Año 1990.
- La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas. Por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López. Año 1991.
- Sistema Nervioso Central (SNC). Por el Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez. Año 1992.
- El Universo del Medicamento. Por el Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro. Año 1993.
- Alimentación y cáncer. Por el Excmo. Señor Don Manuel Ortega Mata. Año 1994.
- Legislación y métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos. Por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.

- Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Por el Excmo. Señor Don Antonio Monge Vega. Año 1996.
- Impresiones sobre Severo Ochoa. Por el Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
- Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos. Por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998.
- Farmacología de la Inflamación. Por el Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
- Moléculas y Comunicación Biológica. Por el Excmo. Señor Don Manuel Ruiz Amil. 2000.
- Supervivencia e individualidad en Biología. Por el Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso. Año 2001.
- Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos. Excma. Señora Doña María Cascales Angosto. Año 2002.
- Terapéutica Farmacológica en el anciano. Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.
- La conservación del suelo. Base de su sostenibilidad y soporte de salud. Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez. Año 2004.
- Avances en Geobotánica. Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez. Año 2005.
- Europa y globalización de la Sanidad. Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Año 2006.

## 6. Otras publicaciones

- Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Por el Excmo. Señor Don Rafael Roldán Guerrero. Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, Año 1975. Tomo IV, Año 1976.
- Código Deontológico Farmacéutico. Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
- Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos. Año 1992.
- Tríptico explicativo de «El Museo de la Real Academia de Farmacia». Año 1995.
- Colección de tarjetas postales sobre el «Museo de la Real Academia de Farmacia». Por la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> del Carmen

- Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1998.
- Jornada sobre Atención Farmacéutica. Año 1998.
  - Avances de la Ciencias a través del Premio Nobel. Por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
  - El Museo de la Real Academia de Farmacia. Por la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> Del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1999.
  - Historia de la Real Academia de Farmacia. Por el Excmo. Señor Don Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado, anotado e ilustrado por la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> del Carmen Francés Causapé. Año 2002.
  - Lecturas Singulares 1. Del corazón y la mente. Excmo. Señor Don Manuel Losada Villasante. Año 2005.
  - Lecturas Singulares 2. Recuerdo y desagravio a León Felipe. Excmo. Señor Don Mariano Turiel de Castro. Año 2006.
  - Lecturas Singulares 3. La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra. Año 2006.
  - Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas: Obdulio Fernández y Enrique Molés. Coordinador: Excmo. Señor Don Francisco González de Posada. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia y Amigos de la Cultura Científica, Academia de Ciencias e Ingeniería de Lanzarote. Año 2006.
  - En memoria de un maestro. Ángel Santos Ruiz. Editora: Doctora María Cascales Angosto.



## NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

### A. Política Editorial

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral que publica trabajos de investigación básica o aplicada relacionados con las ciencias farmacéuticas y afines.

2. Serán aceptados y considerados para publicación, aquellos manuscritos que no hayan sido publicados previamente (excepto resúmenes), que actualmente no estén siendo revisados en otras revistas, que su publicación haya sido aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables de los laboratorios donde se ha desarrollado el trabajo, y que si es aceptado, no será publicado en otra revista en la misma forma, en el mismo o diferente idioma, sin el consentimiento de los Editores.

3. El manuscrito original, una copia y la versión electrónica en CD, se enviará, con la correspondiente carta de presentación, a la siguiente dirección:

Doctora María Teresa Miras Portugal  
 Editora de los ANALES DE LA REAL  
 ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA  
 Real Academia Nacional de Farmacia  
 C/ Farmacia, 11  
 28004 Madrid  
 España  
 Fax: 91 531 03 06

Existe la posibilidad de enviar el manuscrito en formato electrónico como archivo adjunto a la siguiente dirección: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com). Tanto el texto como las figuras deberán ser enviadas en archivos separados. Los formatos aceptados son: .doc (Word) para el texto, y formato TIFF, JPG o PPT (Power Point) para las figuras.

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

— REVISIONES: no deben tener una extensión superior a las 4.000 pala-

bras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones deben contactar previamente con el Editor.

- ARTÍCULOS ORIGINALES: no deben tener una extensión superior a 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas.
- COMUNICACIONES BREVES: artículos breves y definitivos. El manuscrito debe ser identificado como tal en la carta de presentación. La extensión no sobrepasará las 2.500 palabras incluyendo la bibliografía (no más de 10 citas) y con un máximo de tres figuras/tablas.
- CARTAS AL EDITOR: no deben superar las 1.000 palabras de extensión con un máximo de tres citas bibliográficas. Las cartas deben enfocarse en comentar artículos publicados previamente, o tratar diferentes aspectos de Política Educativa, Sanitaria y Ciencias Farmacéuticas.
- INFORMACIÓN ACADÉMICA: esta sección dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros, novedades editoriales y otros eventos que la revista considere de interés para los lectores.

### B. Organización de los manuscritos

Todos los elementos o partes del manuscrito deben ir a doble espacio, todas las páginas numeradas en la esquina superior derecha empezando en la página de la portada. Los manuscritos referentes a artículos originales deberán

contener, en este orden, los siguientes apartados:

## 1. PORTADA

### Título

Debe ir tanto en español como en inglés. Tendrá una extensión inferior a los 100 caracteres, excluyendo los espacios entre palabras.

### Nombre de los autores

El nombre completo de todos los autores y su afiliación institucional. En los trabajos que tengan más de un autor y más de una Institución, indicar la afiliación individual mediante números en superíndices.

### Palabras Clave

Cinco palabras clave (en español y en inglés) que no aparezcan en el título.

### Información de contacto

Nombre, dirección postal, número de teléfono, fax y dirección de correo electrónico del autor al que se enviarán las galeradas.

### Lista de Abreviaturas

Las abreviaturas y su significado deben incluirse en una lista en el mismo orden en el que se mencionan en el artículo.

## 2. PÁGINA DEL RESUMEN

Incluirá el resumen del artículo en español y en inglés. Deberá escribirse como texto continuo y se organizará del siguiente modo: una pequeña introducción donde se expliquen los antecedentes y los objetivos del trabajo, principales resultados y, finalmente, las conclusiones. Su extensión no debe superar las 250 palabras.

## 3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

### • INTRODUCCIÓN

Exponer información principal y antecedentes del tema que puedan orientar al lector.

### • MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

En esta sección se explicarán los métodos experimentales empleados en el trabajo con un nivel de detalle suficiente que permita a otros investigadores repetir el trabajo; para aquellos métodos empleados sin modificaciones significativas respecto al método original, la citación del trabajo original será suficiente.

#### Experimentación en humanos

En aquellos trabajos de investigación que requieran de seres humanos, se deberá proporcionar: (a) consentimiento por escrito de cada paciente o sujeto sano; (b) el protocolo del estudio conforme con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, reflejado por la aprobación del comité apropiado de revisión de la institución. Se hará referencia a cada paciente mediante números, no mediante iniciales.

#### Experimentación animal

En los estudios en los que se emplee experimentación animal, se asegurará que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH publicación 86-23, revisada en 1985).

#### Fabricantes y proveedores

Incluir los nombres y las localidades (ciudad y estado o país) de los fabricantes y proveedores cuando se mencionen fármacos, instrumentación, aparatos, software, etc.

### • RESULTADOS

Se presentarán los principales hallazgos del estudio en forma gráfica cuando sea posible. No ilustrar los pequeños detalles si su información puede ser descrita adecuadamente mediante texto.

## • DISCUSIÓN

En esta sección se presentarán de forma concisa las implicaciones de los nuevos hallazgos en el campo que corresponda, minimizando la reiteración de los resultados, evitando la repetición de información dada en la introducción, y ajustándose al enfoque y objetivo inicial del trabajo.

## • AGRADECIMIENTOS

Se incluirán los agradecimientos al personal de apoyo y a proveedores de reactivos especiales. Las becas y ayudas financieras se deberán incluir en esta sección.

## • BIBLIOGRAFÍA

Las citas bibliográficas tienen que numerarse entre paréntesis en la línea de texto, por ejemplo (7), o (11-13, 17), en el orden de citación en el texto. La bibliografía se incluirá al final del artículo. Sólo se podrán citar como artículos «en prensa» a aquellos de los que se incluye una copia de la carta de aceptación en el envío inicial. Las citas deben incluir el título completo del artículo y citarse en el siguiente formato:

Ejemplos de revistas (1) (2) y libros (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B.J. y SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. y NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. en: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

## • TABLAS

Cada tabla debe ir preparada en hoja individual, a doble espacio y numeradas consecutivamente con números arábigos en el orden en el que aparecen en el texto. No duplicar material que ya haya sido presentado en una figura.

## • LEYENDAS DE FIGURA

Las leyendas deben ir numeradas con números arábigos en el mismo orden en el que aparecen en el texto. El título de la leyenda de la figura no debe aparecer dentro de la propia figura, y debe proporcionarse suficiente información para que la figura sea inteligible sin hacer referencia al texto. Dentro de la leyenda deben ser explicados todas las abreviaturas y símbolos. Las leyendas de figura aparecerán todas de manera consecutiva en hoja aparte.

## • FIGURAS

La revista solicita un juego completo de figuras. En el reverso de cada figura debe ir marcado en lápiz el número de cada figura, su orientación y el nombre del primer autor.

### Blanco y negro

La revista alienta el envío de figuras en blanco y negro. Éstas deben ser impresiones láser de dibujos en blanco y negro y fotografías en brillo de alto contraste de todas las figuras de semitono, por ejemplo, microfotografías, geles, etc.

### Color

Proporcionar impresiones en papel brillante donde los símbolos y texto se aprecien claramente frente al fondo de la figura. El Editor y el Comité Editorial seleccionarán las figuras en color que serán publicadas.

Las figuras en color deben tener un alto contraste, sin fondo coloreado y con la posibilidad de aparecer en blanco y negro en la versión impresa de la revista.

Como se indicó previamente, si el envío del manuscrito se realiza vía e-mail, no es necesario mandar el juego completo de figuras impreso en papel.

### **PERMISOS**

Citaciones directas, tablas o ilustraciones tomadas de material protegido por copyright, deben ir acompañadas del permiso escrito del Editor y el autor original para poder ser utilizadas.

### **REVISIÓN Y PUBLICACIÓN**

Todos los manuscritos enviados para publicación serán revisados por dos evaluadores del área de referencia del trabajo. El Editor elegirá los evaluadores más apropiados para cada manuscrito. El manuscrito que requiera más de una revisión o que en el plazo superior a dos meses no sea remitido a la revista desde la decisión editorial inicial, se considerará como un nuevo envío.

La revista no realiza cargos por página. Una vez que el trabajo ha sido publicado, se envían 25 copias impresas del mismo al autor. También se proporcionará la versión en PDF del artículo.

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### A. Editorial Policy

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* is a quarterly journal that publishes basic and applied research on pharmaceutical sciences and related areas.

2. A manuscript is accepted for consideration for publication with the understanding that it has not been published elsewhere (except in abstract form), that it is not concurrently under review elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and the Publisher.

Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright.

The journal publishes articles written in Spanish or English.

3. An original, a copy, and the electronic version on CD of the manuscript should be sent with a cover letter to:

María Teresa Miras Portugal PhD.  
Editor, ANALES DE LA REAL  
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA  
Real Academia Nacional de Farmacia  
C/ Farmacia, 11  
28004 Madrid  
Spain  
Fax: 91 531 03 06

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com). The text and the figures should be submitted in separate files. The accepted formats are: .doc (Word) for the text, and TIFF, JPG or PPT (Power Point) for figures.

### 4. Types of Manuscript.

The journal will consider and publish the following:

- **REVIEWS:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, references, title page but including legends to figures and tables) and the reference list need not be exhaustive (no more than 40). While most reviews are invited by the Editors, authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor.
- **ORIGINAL ARTICLES:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, title page, and references, but including legends to figures and tables), and include no more than 40 references.
- **RAPID COMMUNICATIONS:** brief, definitive reports. The manuscript should be identified as such in the cover letter. The length should no longer than 2,500 words including references (no more than 10) and with a maximum of three figures/tables.
- **LETTERS TO THE EDITOR:** should be no longer than 1,000 words and include no more than three bibliographic references. Letters should focus on commenting or enlarge previous published articles, or deal with some aspects of educational or sanitary policy and pharmaceutical sciences.
- **ACADEMIC INFORMATION:** this section will inform about different courses, scientific sessions and others events that the journal deem appropriate.

### B. Manuscript Organization

All elements of a manuscript should be double-spaced, and all pages must be numbered in the upper right corner, starting with the title page. Manuscripts describing original research should contain, in this order, the following elements:

**1. TITLE PAGE****Title**

It must be in Spanish and in English. No more than 100 characters, not including spaces between words.

**Author Names**

The full names of all authors and their institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number.

**Keywords**

Five keywords (in Spanish and in English) that do not appear in the title itself.

**Contact Information**

Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address for author to whom proofs should be sent.

**List of Abbreviations**

Include the expansions and list in the order of their mention in the paper.

**2. ABSTRACT PAGE**

Should contain the summary in both Spanish and English. Write as continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. Do not exceed 250 words.

**3. MANUSCRIPT SECTION****• INTRODUCTION**

Provide the minimum background information that will orient the general reader.

**• MATERIAL AND METHODS (EXPERIMENTAL PROCEDURES)**

Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification,

citation of the original work will suffice.

**Human Subjects**

For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

**Animal Experimentation**

In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

**Manufacturers**

Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

**• RESULTS**

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures.

**• DISCUSSION**

In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

• **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Grant and other financial support should be listed in this section.

• **REFERENCES**

These should be numbered in parentheses on the line, e.g. (7), or (11-13,17), in order of citation in the text. The list of references will be printed at the end of the paper. Articles may only be cited as «in press» if a copy of the acceptance notice is supplied at the time of submission. References should include the title of the article and be cited as follows:

Examples of journals (1) (2) and books (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B. J. & SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. & NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• **TABLES**

Prepare tables on individual sheets of paper, double-spaced, and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

• **FIGURE LEGENDS**

Number with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. Type figure legends consecutively on a separate sheet of paper.

• **FIGURES**

The Journal requires *one* set of figures. Mark the back of each figure in pencil with the figure number, its orientation, and the name of the first author.

**Black and White**

B/W figures are encouraged. Provide clean laser prints of black and white drawings and high-contrast glossy 18-cm-wide photographs of all halftone figures, e.g., photomicrographs, gels, etc.

**Colour**

Provide glossy prints in which lettering and symbols are clearly visible against the background. The Editor and the Editorial Committee will select the colour figures to be published.

As for the printed figures they should be contrasted, without colour background, and with possibility to appear in black and white in the printed version.

As indicated, if submission is carried out via e-mail, no printed figures are required.

**PERMISSIONS**

Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

**PEER REVIEW AND PUBLISHING**

The Journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. The Editor will choose the appropriate reviewers for each manuscript. A manuscript requiring more than a single revision or returned

beyond 2 months of the date of the initial decision will be considered a new submission.

There are no page charges. Twenty-five offprints are provided free of charge to the corresponding author of each accepted article. The article in PDF version is also provided.







MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA

[www.ranf.com](http://www.ranf.com)