

ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE

FARMACIA



2007

VOLUMEN LXXIII

Núm. 2

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

• 28004 MADRID

ANALES
DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA
PUBLICACIÓN TRIMESTRAL

AÑO LXXIII	2007	Núm. 2
------------	------	--------

ISSN - 1697-4271

ÓRGANO RECTOR
 LA COMISIÓN DE PUBLICACIONES
 DIRECTOR:

Coden - **ARAFAY**

Dr. ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO
 EDITORA CIENTÍFICA:
 Dra. M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

SUMMARY

Review Articles

- The effect of the fungicide prochloraz-manganese on the verticillium disease of the cultivated white mushroom:
Concepción García Mendoza 403
- The soil: Integration of mineral and organic components:
Juana González Parra 419

Original Articles

- Glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid Assay are affected by P2X agonist BzATP: **Patricia Marín-García, Jesús Sánchez-Nogueiro, David León** 441
- Effect of maternal undernutrition on fetal pancreatic β cell development, growth and functionality: involvement of the IGF system: **Elisa Fernández Millán, M. Ángeles Martín Arribas, Carmen Álvarez Escolá** 453

Application of V_{c3} topographic QSPR parameters to benzene sulfonamida substances derivatives: Edward Cornwell	493
---	-----

Sessions

White biotechnology and pharmaceutical industry: José María Sánchez Montero	501
Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact: Herbert Zimmermann, Santosh K. Mishra, Varsha Shukla, David Langer, Kristine Gampe, Ivette Grimm, Jasmin Delic, Norbert Braun	537

Obituary

Obituary session in honor of Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano: Jesús Izco Sevillano, Gonzalo Giménez Martín, Juan Ramón Lacadena Calero, Juan Manuel Reol Tejada	567
---	-----

ACADEMIC NEWS

— <i>Scientific Sessions</i>	603
— <i>Special Scientific Session: Pharmaceutical Science Terminological Dictionary Presentation</i>	606
— <i>News</i>	637
— <i>Instructions to Authors</i>	641

Efecto del fungicida procloraz-manganeso en la verticiliosis del champiñón cultivado

Recibido el 1 de marzo de 2007

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA*

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid

RESUMEN

El procloraz-manganeso, fungicida usado rutinariamente para controlar la verticiliosis o «mole seca» de los cultivos comerciales de champiñón producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola*, en la DL_{50} calculada para el patógeno, inhibe parcialmente la síntesis de proteínas de sus paredes celulares, reestructurando al mismo tiempo, ciertos polisacáridos neutros de las mismas paredes celulares. El hongo hospedador, el Basidiomiceto *Agaricus bisporus* cultivado para la alimentación humana, tratado con su correspondiente DL_{50} de procloraz-manganeso, modifica también parcialmente las proteínas y determinados polisacáridos de las paredes celulares de su micelio vegetativo. Sin embargo las paredes celulares del micelio agregado (carpóforos) de *A. bisporus*, utilizando la citada DL_{50} o la $DL_{50} \times 1000$ de dicho fungicida, reestructuran de forma algo distinta sus componentes mayoritarios de acuerdo con la dosis empleada. El efecto progresivo del procloraz-manganeso se manifiesta también inhibiendo parcialmente la producción industrial de champiñón y modificando ligeramente la morfología de la superficie de los carpóforos.

Palabras clave: Fungicida procloraz-manganeso.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Pared celular.—Inhibición parcial de proteínas.—Reestructuración de polisacáridos.

* E-mail: cgm@cib.csic.es

ABSTRACT

The effect of the fungicide prochloraz-manganese on the verticillium disease of the cultivated white mushroom

The prochloraz-manganese, fungicide routinely used to control the verticillium disease or «dry bubble» of the white mushroom commercial cultures, produced by the fungus Hyphomycete *Verticillium fungicola*, in the presence of the LD₅₀ calculated for the pathogen, partially inhibits the protein synthesis of its cell walls, while at the same time, restructuring certain neutral polysaccharides of the same cell walls. The host fungus, the Basidiomycete *Agaricus bisporus* cultivated for human nutrition, treated with its corresponding LD₅₀ of prochloraz-manganese also partially modifies its vegetative mycelial cell walls with regard to the proteins and determined polysaccharides. However the aggregated mycelial cell walls of the *A. bisporus* fruit bodies using the cited LD₅₀ or the LD₅₀x1000 of the same fungicide, restructure their major components in a rather distinct way according to the amounts employed. The progressive effect of the prochloraz-manganese is also evidenced by the partial inhibition of the industrial production of white mushrooms and the slight modifications of the surface morphology of the fruit bodies.

Key words: Fungicide prochloraz-manganese.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Cell wall.—Partial protein inhibition.—Polysaccharide restructuration.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos industriales del hongo Basidiomiceto superior *Agaricus bisporus* (Lange, Imbach) sufren con demasiada frecuencia la enfermedad verticiliosis denominada por los cultivadores «mole seca» del champiñón, producida por el parasitismo del hongo imperfecto Hifomiceto *Verticillium fungicola* (Preuss, Hassebrauk) sobre los carpóforos del citado *A. bisporus*, ocasionando pérdidas millonarias en el sector tanto en nuestro país como en todos los que se dedican a este cultivo. Dicha micosis ha tratado de controlarse introduciendo severas medidas de higiene tanto en las instalaciones como en el personal cultivador, junto con la aplicación rutinaria de diferentes pesticidas. Con estos fines se han utilizado diferentes fungicidas, pero es difícil encontrar sustancias que actúen específicamente sobre el micopatógeno, y que no afecten al menos parcialmente al hospedador, que en este caso particular se trata igualmente de un hongo aunque perteneciente a otro grupo taxonómico más evolucionado.

nado. Además el uso indiscriminado de tales fungicidas está ocasionando pérdidas paulatinas de actividad frente al patógeno por la producción de diferentes tipos de resistencias (1, 2, 3). La introducción del procloraz en 1983 para combatir *V. fungicola* aportó no sólo un buen control de la verticiliosis sino también un aumento significativo de la cosecha de champiñones sanos (4, 5), de ahí que su empleo se generalizara, con la consiguiente aparición de nuevas resistencias así como con el incremento paulatino de las dosis efectivas (Tabla 1) aunque, en la actualidad, todavía sigue siendo el producto más utilizado para el control del micopatógeno (6).

TABLA 1. *Distintas DL₅₀ de procloraz-manganeso de tres cepas de Verticillium fungicola en relación con su origen y año de su aislamiento*

Cepas <i>V. fungicola</i>	Año de aislamiento	DL ₅₀ (mg/L)
CBS	1969	0,57
CIES 210	1992	1,71
CIES 100	2000	3,99

La cepa CBS procede del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda) y las cepas CIES han sido aisladas en el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, España.

El procloraz (Figura 1), (N,propil-N(2(2,4,6, triclórofenoxi)-etil)imidazol-1,carboxamida en forma de complejo de manganeso penetra en el interior celular de los hongos, habiendo sido descrito por su modo de acción como inhibidor de la biosíntesis de ergosterol (7, 8, 9) al bloquear la desmetilación del C-14 del lanostenol en su paso a ergosterol, junto con otros posibles lugares de actuación, como la inhibición parcial de la síntesis de proteínas, por lo que se le considera un «fungicida multipuntual» (7). Este fungicida, bajo la denominación de «Sporgon» ha sido autorizado en España y otros países europeos para su aplicación en el cultivo de champiñón en forma de tres dosis preventivas, dejando un plazo de seguridad mínimo de dos días para la posterior recolección de los correspondientes carpóforos.

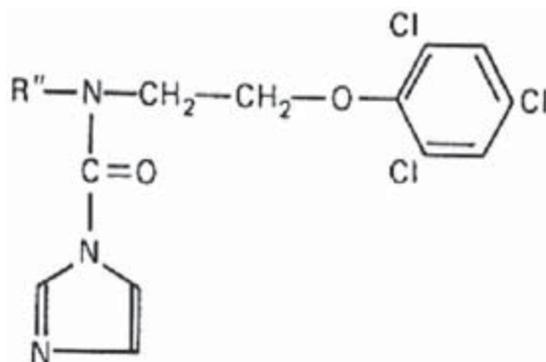


FIGURA 1. Estructura química del procloraz.

El hecho de que el micoparásito *V. fungicola* sólo sea capaz de infectar los champiñones (micelio agregado) del hospedador *A. bisporus* pero no su correspondiente micelio vegetativo, cuyas paredes celulares difieren entre sí significativamente (10, 11), nos muestra el importante papel que desempeña la pared celular de los organismos implicados en este tipo de procesos de parasitismo. Por otra parte, se ha podido demostrar que en la infección de los carpóforos de *A. bisporus*, el micoparásito secreta las enzimas hidrolíticas necesarias para digerir *in vivo* las paredes celulares del micelio agregado, penetrando inter- e intracelularmente hasta producir claras zonas de lisis en las hifas del hospedador, con la consiguiente muerte celular del mismo (12). Tales enzimas de *V. fungicola* son capaces de digerir también *in vitro* las paredes celulares aisladas de los carpóforos de *A. bisporus* (13), con lo que se demuestra de nuevo la especificidad de estas paredes celulares como sustrato de las correspondientes enzimas hidrolíticas. Pero sin embargo *in vivo* el micelio vegetativo de *A. bisporus* no manifiesta la digestión enzimática de sus paredes celulares por dichos enzimas de *V. fungicola*, y por tanto no aparece la infección en este último micelio, mientras que, por el contrario, tales enzimas *in vitro*, sí degradan las citadas paredes celulares aisladas (14), lo que implica la existencia de otros mecanismos adicionales, además de los enzimáticos ya citados, para que la infección se desarrolle y manifieste de forma evidente.

Estudios realizados en otros tipos de micoparasitismo (15, 16) han mostrado la necesidad de unas etapas previas a las enzimáticas,

relacionadas con la adhesión y/o el reconocimiento entre ambos organismos. En estos procesos tan selectivos la estructura química de las correspondientes paredes celulares del hospedador y del parásito vuelve a jugar un papel primordial de tal manera que, determinados componentes de ambas paredes celulares como las proteínas hidrofobinas presentes tanto en *V. fungicola* (17) como en ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* (18, 19), junto con el mucílago de este último organismo (10, 11) han mostrado ser los responsables del contacto o adhesión inespecíficos que tienen lugar como primera etapa (20). A continuación, un heteropolisacárido de las paredes celulares del micoparásito, concretamente el glucogalactomanano de *V. fungicola* (21), que presenta una afinidad altamente específica frente a una proteína lectina asociada a las paredes celulares de los carpóforos de *A. bisporus* (22), reconoce y se une específicamente con ella, con lo que se desencadena la subsiguiente señalización molecular que culmina con la digestión enzimática de las paredes celulares de los carpóforos, fase evidente de la verticiliosis.

Una vez establecida la importancia de determinados componentes de la estructura química de las paredes celulares tanto del micopatógeno como del hospedador —«moléculas diana»— para el desarrollo de la verticiliosis del champiñón (23), el efecto inhibitorio producido por el fungicida procloraz-manganeso sobre dicha micosis debe de reflejarse de alguna forma sobre la estructura química de las envolturas celulares implicadas.

Desde el punto de vista de protección de las cosechas vegetales frente a la infección por los hongos fitopatógenos, el procloraz-manganeso ha sido clasificado como fungicida no-sistémico o pobremente sistémico por su baja penetración en las células de los hospedadores vegetales tratados habitualmente (24), y de ahí su uso tan extensivo. Pero al darse la circunstancia de que en el caso de la verticiliosis del champiñón el organismo hospedador *A. bisporus* no se trata de un vegetal sino también de otro hongo, como su correspondiente micopatógeno *V. fungicola*, el efecto del fungicida tiene que manifestarse también sobre dicho hospedador, teniendo bien presente además que tal hongo hospedador es objeto de cultivo para la alimentación humana.

Como las paredes celulares de ambos organismos han sido objeto de estudio detallado para llegar a desentrañar los mecanismos ce-

lulares y moleculares de la verticiliosis (10, 11, 20), el efecto del procloraz-manganeso sobre tales envolturas celulares nos puede conducir a poder explicar por una parte, la diferente patogeneidad experimental de ciertas cepas salvajes de *V. fungicola* aisladas después del tratamiento rutinario del fungicida y por otra, a comprobar el alcance del empleo del procloraz-manganeso sobre *A. bisporus* como organismo cultivado para la alimentación humana, y evitar los posibles efectos negativos, tanto en cuanto a su producción como en sus características agronómicas y nutricionales. A este respecto se debe hacer constar que, estudios precedentes realizados sobre la administración oral de procloraz-manganeso a ratas han mostrado su total metabolización y excreción (25, 26).

EFFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-MANGANESO SOBRE LAS PAREDES CELULARES DEL MICELIO DEL MICOPATÓGENO *VERTICILLIUM FUNGICOLA*

El control de los hongos mediante productos químicos es un problema que entraña gran dificultad debido a que de una manera general los micelios fúngicos, dada su poca uniformidad, presentan propiedades ilimitadas para regenerar a partir de un fragmento mínimo de hifa superviviente después de cualquier tratamiento químico inhibitorio. Por otra parte la diferente composición y estructura químicas de las paredes celulares fúngicas a lo largo de su correspondiente ciclo biológico (micelios vegetativos y agregados) hace que la penetración del fungicida al interior celular sea diferente en cada caso.

Los estudios realizados sobre el modo de acción del procloraz-manganeso a su DL_{50} sobre las paredes celulares de *V. fungicola* (27, 28) han mostrado que el efecto más inmediato producido por el fungicida sobre las citadas envolturas celulares es una inhibición parcial de la síntesis de sus proteínas compensada en parte por un aumento de los carbohidratos neutros totales. El estudio más detallado de la estructura química de estos carbohidratos mediante cromatografía gas-líquido (CGL) asociada a espectrometría de masas (EM) después de realizar su metilación e identificados como glucanos y glucogalactomananos (21), muestra que el fungicida produce una

reestructuración parcial cuali- y cuantitativa de ambos tipos de polisacáridos (Figura 2), perdiendo parte de sus ramificaciones los glucanos, y disminuyendo la proporción de glucosa junto con un aumento de las cadenas laterales terminales de galactosa unidas al esqueleto de manosa en los glucogalactomananos (27, 28). Paralelamente una de las proteínas de estas paredes celulares de *V. fungicola*, inhibidas parcialmente por la acción del procloraz-manganeso, ha podido ser identificada como hidrofobina (17), demostrándose mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión (27), su disminución progresiva en la superficie de las paredes celulares de las hifas.

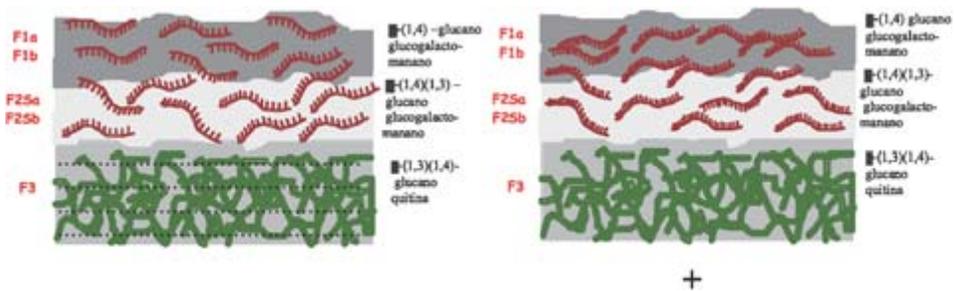


FIGURA 2. *Esquemas comparativos de las redes polisacáridicas estructurales de las paredes celulares del micelio de Verticillium fungicola en ausencia y presencia del fungicida.*

Estas modificaciones químicas estructurales de los polisacáridos, especialmente de los glucogalactomananos de *V. fungicola*, junto con la disminución de la proteína hidrofobina, producidas por el efecto del procloraz-manganeso, afectan claramente tanto al proceso de contacto inespecífico entre el hospedador y el micopatógeno (20), como al de reconocimiento y unión específicos entre ambos organismos, previos al desencadenamiento evidente de la infección (22, 29, 30). Por una parte, la menor proporción de la proteína hidrofobina debe afectar parcialmente al citado contacto inespecífico, con el consiguiente efecto positivo frente a la verticiliosis, pero lo que es más importante, en el reconocimiento específico entre las «moléculas diana», el glucogalactomanano de *V. fungicola* y la lectina de *A. bisporus*, se produce un aumento de afinidad entre las mismas (22) debido al incremento de las cadenas laterales termina-

les de galactosa del glucogalactomanano, que son las que reconocen y se unen específicamente a la lectina. De esta forma el fungicida parece estar produciendo sobre *V. fungicola* efectos contrapuestos, al inhibir parcialmente la adhesión o el contacto inespecífico, que corresponde al efecto que se busca, y al mismo tiempo incrementando, también parcialmente, el reconocimiento y unión específicos entre las «moléculas diana» del micoparasitismo, el glucogalactomanano y la lectina citados (22). Este último efecto explica, al menos en parte, el aumento de un tipo de resistencia de *V. fungicola* frente al procloraz-manganeso, que va en paralelo con el incremento progresivo necesario de las dosis a utilizar para llegar a controlar la verticiliosis (Tabla 1).

A la vista de todos estos hallazgos se hace necesario, en un futuro inmediato, desarrollar estrategias alternativas (23) para controlar la micosis objeto de estudio, eliminando el uso rutinario del procloraz-manganeso así como, de forma general, el de otros fungicidas químicos empleados habitualmente en agricultura, debido al coste medioambiental que conlleva la aplicación de tales pesticidas.

**EFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-MANGANESO
SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE LOS MICELIOS
VEGETATIVO Y AGREGADO DEL HOSPEDADOR**
Agaricus bisporus

Los experimentos realizados sobre los cultivos industriales de champiñón en ausencia y presencia de procloraz-manganeso en sus dosis DL_{50} y $DL_{50} \times 1000$ determinadas sobre el micelio vegetativo de *A. bisporus*, han mostrado un efecto progresivo del fungicida sobre los carpóforos en relación con la cantidad utilizada. Cuando se utiliza la DL_{50} no se afectan prácticamente, ni la producción de los carpóforos ni las características agronómicas de los mismos, aunque ya se pueden detectar diferencias significativas en el análisis químico estructural de las paredes celulares de las hifas que conforman tal micelio agregado, como describiremos seguidamente. Si la dosis utilizada es la $DL_{50} \times 1000$ (muy próxima a la dosis agronómica recomendada como preventiva de la verticiliosis en los cultivos comerciales) la producción industrial se inhibe entre un 2,43 y un 3,14%

(Figura 3), la superficie de los carpóforos muestra ligeras variaciones en su textura, y las correspondientes paredes celulares reestructuran determinados componentes polisacáridicos (30).



FIGURA 3. *Cultivo comercial de champiñón en ausencia y presencia de Procloraz-Mn en su dosis DL₅₀x1000. Se observa el efecto inhibitorio producido por el fungicida en tres recipientes frente al control sobre el inicio de la primer florada de champiñón, que se llegará a recuperar posteriormente al final de dicha florada, pero sin alcanzar al testigo.*

En relación con la estructura química de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, la acción del procloraz-manganeso en su correspondiente DL₅₀ es, en parte, semejante al efecto descrito sobre las paredes celulares de *V. fungicola*, es decir, una inhibición parcial de la síntesis de proteínas, pero en este caso compensada por un ligero aumento de los carbohidratos aminados (28), a diferencia de los carbohidratos neutros en el micopatógeno. El análisis estructural de los polisacáridos afectados por el fungicida y deducido de los estudios de CGL y EM refleja la reestructuración cuali- y cuantitativa preferente de los heteroglucanos constituyentes de las fracciones FI, FII y FIII de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* (Figura 3), produciendo un enriquecimiento del componente mayoritario, la glucosa, por la desaparición de la manosa

y/o de la xilosa (en FII y FIII), junto con significativas variaciones en sus correspondientes enlaces glicosídicos, lo que se traduce en una tendencia de dichos polisacáridos a hacerse más ramificados (30).

Estudios paralelos realizados sobre las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* han puesto de manifiesto igualmente un efecto más predominante del procloraz-manganeso sobre determinadas fracciones heteroglucánicas (FI, FII y FIV) originando una cierta disminución de la glucosa compensada por un aumento de la manosa o de la xilosa (en FI y FII). Estas variaciones cuali- y cuantitativas de los monosacáridos constituyentes de tales fracciones (Figura 4), se ven igualmente reflejadas en los tipos de enlaces sacáridicos que las conforman, según se deduce de los estudios realizados mediante CGL-EM, dando lugar igualmente en estas paredes celulares, a un claro incremento de las ramificaciones de dichos polisacáridos (30).

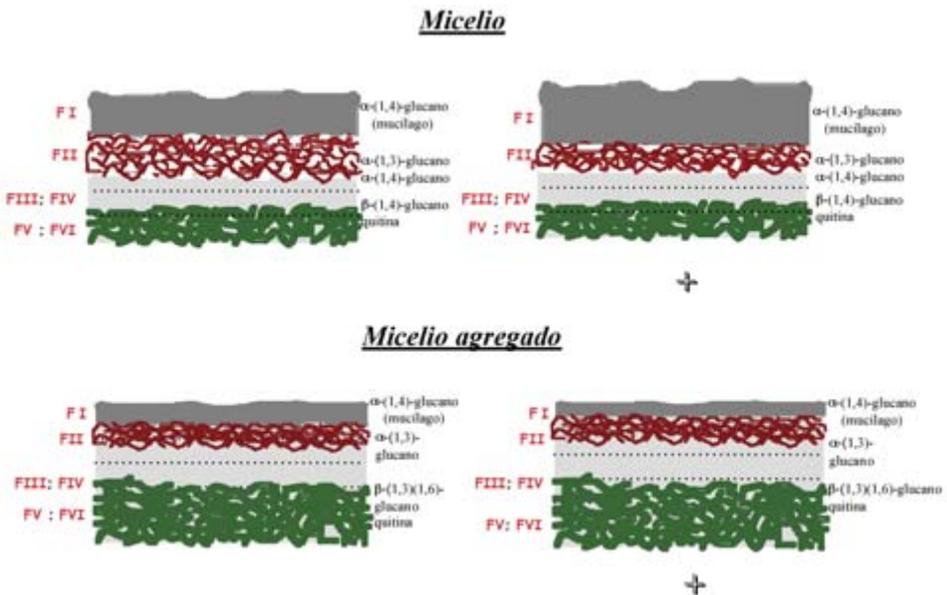


FIGURA 4. *Esquemas comparativos de las redes polisacáridicas estructurales de las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de Agaricus bisporus en ausencia y presencia del fungicida.*

Las variaciones cuantitativas detectadas en el análisis químico de las proteínas de las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* por efecto del fungicida no han podido ser visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión, como en el caso de *V. fungicola*, debido a que el mucílago, red polisacáridica que se encuentra situada en la superficie externa de las dos clases de paredes celulares, enmascara las posibles variaciones ultraestructurales que se hubieran podido producir en las respectivas proteínas hidrofobinas, localizadas dentro de dicha red estructural externa de ambas paredes celulares (29).

CONCLUSIONES FINALES

El primer efecto detectado por el uso rutinario del fungicida procloraz-manganeso sobre los cultivos industriales de champiñón es una ligera inhibición de la producción de carpóforos en relación con la dosis empleada. En presencia de la DL_{50} del fungicida no se produce variación aparente alguna en la producción de dichos cultivos industriales, ni en la morfología de los ejemplares, y sin embargo con la $DL_{50} \times 1000$, cantidad muy próxima a la dosis agronómica actualmente recomendada, se obtienen inhibiciones significativas en la producción de carpóforos, junto con unas ligeras variaciones de la textura en la superficie de los mismos.

El fungicida procloraz-manganeso produce sobre las paredes celulares del micoparásito *V. fungicola* una inhibición parcial de la síntesis de las proteínas y una reestructuración paulatina de los carbohidratos, particularmente de los glucogalactomananos. Tales cambios detectados en la estructura química de dichas paredes celulares por efecto del fungicida pueden parecer contradictorios por cuanto, por una parte, disminuyen parcialmente la adhesión o contacto inespecífico entre el micopatógeno y el hospedador, al inhibir parcialmente la proteína hidrofobina (efecto deseado), pero a la vez aumentan el reconocimiento y unión específicos entre las «moléculas diana» de ambos organismos implicados en la verticiliosis. También se puede deducir que *V. fungicola* aparenta ser menos patógeno en aquellas cepas sin tratar o poco tratadas rutinariamente con el fungicida y que presentan menor DL_{50} mientras que, por el contra-

rio, el procloraz-manganeso parece incrementar la patogeneidad experimental de aquellas cepas que han sufrido un mayor contacto con el fungicida en el tratamiento continuo de los cultivos de champiñón (y que requieren mayor DL_{50}), lo que sugiere la formación de diferentes tipos de resistencia según el tiempo sufrido de exposición al procloraz-manganeso.

En cuanto a las paredes celulares de *A. bisporus*, el efecto producido por el fungicida es algo distinto según se trate de las paredes del micelio vegetativo o del agregado, cuya estructura química también muestra diferencias significativas. En el micelio vegetativo el procloraz-manganeso actúa sobre dichas paredes celulares de modo semejante al micelio de *V. fungicola*, inhibiendo parcialmente la síntesis de proteínas y reestructurando ciertos polisacáridos neutros, a diferencia del micelio agregado, en cuyas paredes se produce inhibición parcial de los aminoazúcares, no detectándose efecto significativo sobre las proteínas, pero igualmente modificándose determinados polisacáridos neutros, haciéndose más ramificados.

A la vista de los resultados precedentes, considerando la pérdida creciente de sensibilidad de *V. fungicola* frente al procloraz-manganeso debido a las resistencias progresivas adquiridas, junto con los cambios químicos estructurales producidos en las paredes celulares de *A. bisporus*, que hasta el momento no parecen afectar de forma significativa sus características agronómicas y alimentarias, se hace patente la necesidad de abandonar en un futuro inmediato el uso de este fungicida para controlar la verticiliosis. Se deben desarrollar otras estrategias alternativas a la utilización rutinaria del procloraz-manganeso como preventivo de la citada micosis, por el hecho demostrado de que el fungicida presenta toxicidad frente a ambos hongos -el micopatógeno *V. fungicola* y el hospedador *A. bisporus*- y este último se cultiva para su utilización en la alimentación humana, aunque estudios realizados recientemente sobre la administración oral de procloraz-manganeso a ratas han demostrado que el fungicida se metaboliza y excreta completamente.

El reciente esclarecimiento de las «dianas moleculares» de la verticiliosis del champiñón nos abre el camino para el desarrollo de otras alternativas con objeto de controlar dicha micosis evitando el empleo de procloraz-manganeso, como pueden ser la utilización de

análogos moleculares al glucogalactomanano o la transformación genética de *A. bisporus* en su proteína lectina.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos experimentales recientes de la autora de esta revisión y que forman parte de la misma han sido financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GEA, F. J.; TELLO, J. C. and HONRUBIA, M. (1996): *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* 136: 133-137.
- (2) BONNEN, A. M. and HOPKINS, C. (1997): Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 101: 89-96.
- (3) GEA, F. J.; NAVARRO, M. J. and TELLO, J. C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycol. Res.* 109: 741-745.
- (4) FLETCHER, J. T. (1981): The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* 11: 597-604.
- (5) GANDY, D. G. and SPENCER, D. M. (1981): Fungicide evaluation for control of dry bubble, caused by *Verticillium fungicola*, on commercial mushroom strains. *Scientia Horticulturae* 14: 107-115.
- (6) FLETCHER, J. T. (1992): Mushrooms-fungicides and disease control. *Mushroom J.* 506: 19-21.
- (7) SIEGEL, M. R. (1981): Sterol-inhibiting fungicides: Effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Dis.* 65: 986-989.
- (8) LEROUX, P. (1991): Résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides. *Phytoma* 434: 20-26.
- (9) BARBERA, C. (1994): Principales grupos de fungicidas. Mecanismos de acción. *Phytoma España* 62: 7-10.
- (10) GARCÍA MENDOZA, C.; AVELLÁN, M. A.; SÁNCHEZ, E. and NOVAES-LEDIEU, M. (1987): Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* 148: 68-71.
- (11) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C. and NOVAES-LEDIEU, M. (1996): New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*. *Microbiología SEM* 12: 599-606.
- (12) DRAGT, J. W.; GELLS, F. P.; DE BRUIJN, C. and VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (1996): Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycol. Res.* 100: 1082-1086.

- (13) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; GALÁN, B. and NOVAES-LEDIEU, M. (1997): Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* 143: 2999-3006.
- (14) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; BERNARDO, D. and NOVAES-LEDIEU, M. (2000): Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104: 988-992.
- (15) INBAR, J. and CHET, I. (1994): A new isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology* 140: 651-657.
- (16) INBAR, J. and CHET, I. (1996): The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-321.
- (17) CALONJE, M.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Properties of a hydrophobin from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-1034.
- (18) LUGONES, L. G.; BOSSCHER, J. S.; SCHOLTMAYER, K.; DE VRIES, O. M. and WESSELS, J. G. H. (1996): An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* 142: 1321-1329.
- (19) LUGONES, L. G.; WÖSTEN, H. A. B. and WESSELS, J. G. H. (1998): A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetative growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* 144: 2345-2353.
- (20) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and NOVAES-LEDIEU, M. (2003): Mechanisms involved in the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on *Agaricus bisporus* fruit bodies: *Verticillium* disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms. En: *Recent Research Developments in Microbiology*, Vol. 7, Part I. S. G. Pandalai (ed.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 269-278.
- (21) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O. and GARCÍA MENDOZA, C. (2000): Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (22) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): *Verticillium* disease or «dry bubble» of the cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (23) GARCÍA MENDOZA, C. (2005): El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o «mole seca» del champiñón. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 571-586.
- (24) HASSALL, K. A. (1990): The biochemistry and uses of pesticides. 2nd edn. VCH, Weinheim.
- (25) NEDHAM, D. and CHALLIS, I. R. (1991): The metabolism and excretion of prochloraz, an imidazole-based fungicide, in the rat. *Xenobiotica* 21: 1473-1482.
- (26) LAIGNELET, L.; RIVIERE, J. L. and LHUGUENOT, J. C. (1992): Metabolism of an imidazole fungicide (Prochloraz) in the rat after oral administration. *Food Chem. Toxicol.* 30: 575-583.

- (27) BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; PÉREZ CABO, A.; GEA ALEGRÍA, F. J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5: 121-125.
- (28) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and NOVAES-LEDIEU, M. (2004): Bioquímica del empleo de Prochloraz-Mn: modificaciones estructurales en las paredes celulares de los micelios de *Agaricus bisporus* y *Verticillium fungicola* inducidas por el fungicida. En: *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados 2*. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca, pp. 189-201.
- (29) BERNARDO LÓPEZ, M. D. (2003): Bases celulares y moleculares de la verticilio-sis (producida por *Verticillium fungicola*) de los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*) y efecto del fungicida Prochloraz-Mn. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, pp. 123 y 127.
- (30) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M.; PARDO, J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): Comparative studies of the effect produced by the fungicide Prochloraz-Mn on *Agaricus bisporus* vegetative mycelium and fruit body cell walls. *Int. Microbiol.* 7: 277-281.

El suelo: integración de componentes minerales y orgánicos

Recibido el 20 de febrero de 2007

JUANA GONZÁLEZ PARRA*

Catedrática de Edafología. Facultad de Farmacia.

Universidad Complutense.

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El objetivo de este artículo es exponer los principios fundamentales de la Ciencia del Suelo, definir el suelo y presentar sus funciones en nuestro Ecosistema. Las propiedades del suelo influyen en cómo funcionan en un ecosistema y cómo puede mejorarse el manejo para proteger el medioambiente y al mismo tiempo producir alimentos para la sociedad.

Un suelo es un cuerpo natural tridimensional constituido por cuatro componentes fundamentales: materia mineral, materia orgánica, aire y agua. Estos componentes interactúan entre ellos determinando la naturaleza de un suelo. Las relativas proporciones de estos componentes influyen en el comportamiento y productividad de los suelos. Un suelo es el producto de dos procesos, uno destructivo y otro de síntesis, y ejemplo de este último es la formación de partículas coloidales (arcilla y humus). En la mayoría de estos coloides predomina la carga electronegativa capaz de atraer iones de carga opuesta. Los cationes adsorbidos pueden ser intercambiados por otros cationes de la solución del suelo (cambio catiónico). Elementos tóxicos así liberados pueden ser absorbidos por las plantas entrando a formar parte de la cadena alimentaria: suelo → planta → animal → hombre.

Se presenta la hipótesis sobre el origen de la vida, los procesos de formación de péptidos sobre las superficies de minerales de la arcilla (montmorillonitas) y el decisivo papel jugado por el Cu(II), como un conjunto de ideas procedentes de Rode, Bujdak, Le Son, entre otros.

* Correspondencia: Departamento de Edafología. Facultad de Farmacia. UCM. Avda. Complutense, s/n. 28040 Madrid. e-mail: jgparra@farm.ucm.es

La capacidad de los suelos para producir alimentos se está degradando y al mismo tiempo el número de personas que necesitan alimentos incrementa, luego el conocimiento de la Ciencia del Suelo es fundamental para encontrar nuevos recursos que hagan frente a la humanidad en el siglo XXI. Será preciso aplicar los principios básicos de la biología, la química y la física con objeto de minimizar la degradación y destrucción de uno de nuestros más importantes recursos naturales.

Palabras clave: Ciencia del suelo.—Arcillas.—Materia orgánica.—Intercambio Catiónico.—Origen de la vida.

ABSTRACT

The soil: Integration of mineral and organic components

The purpose of this article is to explain the fundamental principles of Soil Science, to define the soil, and to present the functions of soils in our Ecosystem. Soil properties influence how soils function in an ecosystem and how they can best be managed to protect the environment and the same time produce food to support society.

A soil is a three dimensional natural body. In fact, the four major components of soil are: mineral matter, organic matter, air and water. These components interact with each other to determine the nature of a soil. The relative proportions of these components greatly influence the behaviour and productivity of soils. A soil is the product of both destructive and synthetic processes. Formations of colloidal particles (clay and humus) are examples of synthesis. For most soil colloids, electronegative charges predominate. These charges attract ions of an opposite charge to the colloidal surfaces. The adsorbed cations are subject to exchange with other cations held in the soil solution (cation exchange). Toxic elements thus released can be absorbed by plants. Toxic elements become part of the food chain: soil→ plant→ animal→ human.

I present the hypothesis for the origin of life, the peptide formation processes on the clay mineral surface (montmorillonites) and the decisive role played by the catalyst Cu(II), as an amalgam of ideas provided by Rode, Bujdak, Le Son and others.

The capacity of soils to produce food is being degraded, even as the number of people needing food is increasing. A fundamental knowledge of Soil Science is a prerequisite to meeting the many natural resource challenges that will face humanity in the 21st century. The basic principles of biology, chemistry and physics can be used to minimize the degradation and destruction of one of our most important natural resources.

Key words: Soil science.—Clays.—Organic Matter.—Cationic Exchange.—Origin of Life.

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un cuerpo natural tridimensional, situado en la interfase de la litosfera, atmósfera, hidrosfera y biosfera (1). En el año 1994, el Servicio de Conservación de Suelos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos publica una Clave Taxonómica (2) en la que se define el suelo como «el cuerpo natural formado a partir de materiales minerales y orgánicos, que contiene materia viva y que puede soportar vegetación de forma natural. El límite superior es el aire, el límite inferior coincide normalmente con el de la actividad biológica. Está constituido por horizontes próximos a la superficie terrestre, que se diferencian del material rocoso subyacente porque han sido alterados a través del tiempo debido a las interacciones entre clima, relieve, materiales parentales y organismos vivos».

2. ANTECEDENTES DE LA CIENCIA DEL SUELO

En 1924 se crea en Roma la «Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo» (International Society of Soil Science) como denominación más general de una disciplina que había tenido sus comienzos en el año 1883 con Dokuchaev, investigador ruso, marcando el hito inicial de los estudios relacionados con el suelo. Esta Ciencia, desde la década de los treinta, se ha ido desarrollando, según el concepto de suelo a través de los años, en diferentes etapas: agroquímica, geológica, la de química coloidal, el suelo como cuerpo órgano mineral y finalmente la etapa geoquímica.

En España, Huguet del Villar (1871-1951) presidente de la Subcomisión de Suelos Mediterráneos en la 1.^a Asociación Internacional de la Ciencia del Suelo, introdujo el término Edafología (3) en el año 1925 para designar la Ciencia cuyo objeto es el Suelo, definido según este autor como «la película de la corteza terrestre que sirve de medio a la vegetación». Esta película resulta de la actuación de diversos factores: roca, clima, vegetación, microorganismos y el hombre, que actúa más bien como perturbador y destructor. En el año 1944 se inicia la docencia de la Edafología en la licenciatura de Farmacia, debido a una destacada figura en éste campo, José María Albareda, quién había creado en Madrid el Instituto Español de

Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal en el seno del CSIC, alcanzando esta disciplina gran relieve.

A partir de 1960 se desarrolló esta Ciencia abordando dos aspectos diferentes, uno concerniente a la producción agrícola, y otro enfocado a problemas ambientales (4). Las relaciones que tiene con la Geología y Biología son evidentes y hoy se la puede considerar como ciencia intermedia entre ellas e íntimamente relacionada con la Bioquímica (5).

Dentro de los grandes hitos en el desarrollo de la Ciencia del Suelo figura la atribución a los minerales de la arcilla de una estructura cristalina puesta de manifiesto por difracción de Rayos X y además, la de ser una importante fuente de carga negativa lo que les confería una determinada capacidad de adsorción. Los trabajos sobre materia orgánica y el conocimiento sobre los mecanismos de interacción de sustancias húmicas con sustancias minerales supuso otro gran hito en el desarrollo de esta Ciencia (6, 7).

A partir de 1980, los avances en técnicas analíticas hacen posible el estudio de las reacciones entre los minerales del suelo y la interfase acuosa, surge así una nueva ciencia multidisciplinar, «la Ciencia Ambiental Molecular» que aborda la distribución de contaminantes en suelos, aguas y atmósfera. Se abren perspectivas nuevas en el área ambiental, por ejemplo: mecanismos de sorción/desorción de contaminantes, problemas de toxicidad e impacto sobre la salud humana (8-10).

Existen múltiples funciones que los suelos ejercen en la sociedad y en el hombre, entre las que figuran: **El suelo como productor y transformador de biomasa. Como hábitat para la Biota. El suelo como Geomembrana y su papel como: Reactor, Filtro y Tampón** no sólo para nutrientes, sino también para pesticidas, herbicidas y otros contaminantes. Representa el eslabón con la litosfera, hidrosfera y atmósfera. **El papel del suelo en el ciclo global de carbono.**

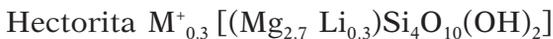
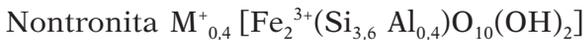
3. COMPONENTES DEL SUELO

3.1. Componentes minerales

La fracción mineral que presenta mayor actividad desde el punto de vista químico es la fracción arcilla, es la de menor tamaño y se caracteriza por tener propiedades coloidales. Los minerales fundamentales de la arcilla corresponden a silicatos laminares: Filosilicatos. Estos minerales están formados por pequeñas partículas constituidas por capas de tetraedros y octaedros. La fórmula estructural que presenta una capa tetraédrica es: $\text{Si}_2\text{O}_5\text{OH}^{3-}$.

Los octaedros pueden llevar en su interior iones Al^{3+} o Mg^{2+} . Si es el aluminio el que ocupa estas posiciones el **mineral es dioctaédrico**, si es magnesio, el **mineral es trioctaédrico**. Los filosilicatos pueden estar constituidos por estructuras 2:1 (dos capas tetraédricas y una octaédrica), 1:1 (una capa tetraédrica y una octaédrica) y 2:1:1 (dos capas tetraédricas y dos octaédricas). Como minerales 2:1 con carga cero están la **Pirofilita** (dioctaédrica) ($\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}\text{OH}_2$) y el **Talco** (trioctaédrico) ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}\text{OH}_2$) (11).

Los átomos de silicio pueden ser parcialmente sustituidos por Al^{3+} , lo que confiere **carga negativa permanente** a la estructura, cuya cuantía dependerá de la sustitución, formándose así nuevos minerales (12). Entre los minerales filosilicatos con estructura 2:1 están las **micas** (di y trioctaédricas con carga -1), **ilitas** (dioctaédricas con carga -0,8), **vermiculitas** (di y trioctaédricas con carga -0,67) y **esmeclitas** (di y trioctaédricas con carga -0,33) (Figura 1). **Entre las esmeclitas dioctaédricas está la montmorillonita**, cuya sustitución isomórfica es en la capa octaédrica (Al por Mg), **entre las trioctaédricas está la hectorita**, con sustitución parcial de Mg por Li en la capa octaédrica (13).



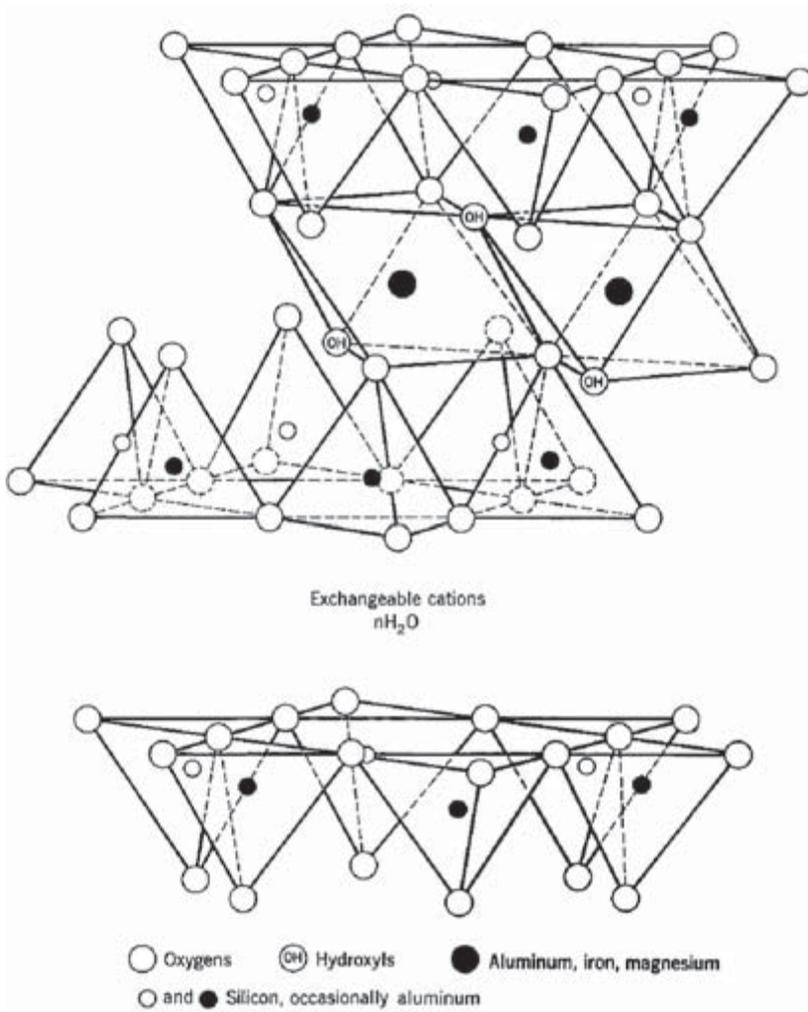


FIGURA 1. *Esquema estructural de un mineral 2:1 (Esmectita).*

Los minerales de estructura 1:1 presentan **carga variable o dependiente del pH**, debido a grupos funcionales SiOH y AlOH que se originan como consecuencia de roturas de bordes en estas estructuras. Entre estos minerales están la **haloisita**, **caolinita** (dioctaédrica) (Figura 2) y **antigorita** (trioctaédrica). A los minerales con estructura 2:1:1 pertenecen las **cloritas**.

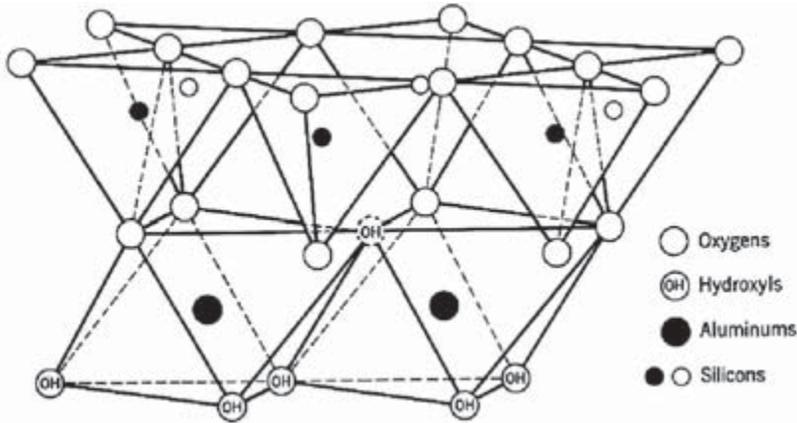


FIGURA 2. *Esquema estructural de un mineral 1:1 (Caolinita).*

Los minerales fibrosos tipo **paligorskita** (atapulgita) y **sepiolita** presentan una estructura en bandas o cadenas y se caracterizan por la existencia de canales (paralelos a estas cadenas) en los que se sitúan moléculas de agua.

Los minerales de la arcilla contribuyen a una de las propiedades fundamentales de los suelos, **la capacidad de intercambio catiónico** (14). Los cationes debido a su carga positiva son atraídos a las cargas negativas (permanentes o variables) de los filosilicatos formando parte del **complejo adsorbente del suelo**. Estos cationes pueden estar hidratados y son factibles de intercambiarse con otros de la solución externa. Por otra parte estos minerales pueden actuar en reacciones de adsorción de pesticidas, impidiendo su degradación, disminuyendo con ello tanto su disponibilidad frente al ataque microbiano, como su concentración en la solución del suelo (15).

3.2. Componentes orgánicos

La fracción orgánica está constituida por todas aquellas sustancias que contienen carbono orgánico, y comprende restos de plantas sin descomponer (hojas, raíces, etc.), residuos microbianos y sustancias muy polimerizadas como productos estables de degradación y síntesis.

La materia orgánica del suelo se puede dividir en: **sustancias no húmicas y sustancias húmicas**. Las primeras incluyen carbohidratos, proteínas, aminoácidos, aminas, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, lignina, alcaloides, antibióticos, auxinas, vitaminas, enzimas y lípidos (grasas, resinas, aceites, etc.). Las sustancias húmicas están constituidas por compuestos de naturaleza ácida y de elevado peso molecular y se han formado por reacciones de síntesis: **ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, huminas y ácidos himatomelánicos** (6, 16).

La estructura de estas macromoléculas se puede describir como un núcleo central o matriz rica en unidades hidroxiquinónicas. Sobre este núcleo se fijan cadenas proteicas o polipeptídicas a través de grupos alfa-aminados de aminoácidos. Las macromoléculas de elevado peso molecular o ácidos húmicos presentan un núcleo de mayor tamaño y cadenas más cortas que la de peso molecular más bajo que corresponden a ácidos fúlvicos (17).

Los ácidos fúlvicos y ácidos húmicos presentan marcadas diferencias tanto en composición como en propiedades: Los ácidos húmicos se caracterizan por mayor polimerización, mayor contenido en C, N, grupos OH fenólicos, elevada capacidad de intercambio catiónico y mayor capacidad de unión con la arcilla. Los ácidos fúlvicos presentan mayor contenido en O, en grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{OCH}_3$, incremento de la acidez y mayor posibilidad de formar quelatos (18).

Los compuestos húmicos influyen en: El **color oscuro** de los suelos. En la **retención de agua**. En la **capacidad de cambio catiónico**, muy superior a la que presentan los minerales de la arcilla. En la fracción orgánica, las cargas negativas proceden de la ionización de grupos $-\text{COOH}$ y en menor medida de grupos $-\text{OH}$ fenólicos, la carga por consiguiente es dependiente del pH. También influyen en la formación de agregados debido a la **capacidad de unión a minerales de la arcilla**. En la **posibilidad de quelación**, formando complejos solubles estables con micronutrientes facilitando su disponibilidad, o con elementos tóxicos, haciendo accesible su transferencia a otros compartimentos como agua y cadena trófica. En la **acción tampón**, ayudando a mantener la reacción uniforme del suelo, impidiendo los cambios bruscos de pH. En la **mineralización**, la materia orgánica es la principal fuente de nutrientes, su descomposición da lugar a CO_2 ,

NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . La mineralización está frenada cuando los compuestos húmicos están formando agregados. Los compuestos húmicos pueden **combinarse con otras moléculas orgánicas** afectando a la persistencia y biodegradación de pesticidas (6).

3.3. Reacciones de la materia orgánica del suelo con iones metálicos

Los componentes del humus (ácidos fúlvicos y ácidos húmicos) son **capaces de formar con metales, complejos que pueden ser, solubles o quelatos e insolubles**. Los ácidos fúlvicos presentan gran capacidad para formar complejos, siendo más solubles que los formados por ácidos húmicos, debido a la mayor acidez y menor peso molecular. **Los complejos órgano metálicos ejercen en los suelos los siguientes efectos** (6):

- Determinan la transferencia de metales a otros compartimentos, como aguas naturales.
- La formación de complejos con Fe y Al mantienen solubles a estos elementos a valores de pH a los que estarían precipitados.
- Influyen en la disponibilidad de micronutrientes en el suelo. Existirá inmovilización de micronutrientes si el complejo es insoluble.
- Ante una elevada concentración de un metal en suelo, la formación de complejos de baja solubilidad reduce los posibles efectos de toxicidad.
- Las reacciones de quelación juegan un importante papel en la alteración química de las rocas y minerales. Los líquenes así como bacterias y hongos contribuyen a la desintegración de rocas al producir agentes quelantes orgánicos.

Los componentes orgánicos pueden reaccionar con los minerales de la fracción arcilla dando agregados arcillo-húmicos, que mejoran la estructura del suelo y condicionan su estabilidad frente a procesos erosivos.

4. PAPEL DE LOS MINERALES DE LA ARCILLA EN EL ORIGEN DE LA VIDA

4.1. Fundamentos geoquímicos

La geoquímica moderna asume que las condiciones existentes hace 3.900 millones de años dieron lugar a la primera masa sólida formada por enfriamiento del magma, al mismo tiempo la actividad volcánica originaba los componentes de la atmósfera de la primitiva Tierra: CO₂, N, agua, dióxido de azufre y pequeñas proporciones de O₂. El posterior enfriamiento hasta una temperatura inferior a 100° C condujo a la condensación de agua a partir de esta atmósfera. Las temperaturas que prevalecieron eran próximas al punto de ebullición del agua, alternando procesos de evaporación/condensación, que podían haber conducido a descargas eléctricas. Se ha demostrado que tal mezcla de gases produce aminoácidos cuando se expone a descargas eléctricas originadas por luz ultravioleta o radiaciones cósmicas (19).

Las primeras trazas de bioactividad se han encontrado en rocas de 3.800 millones de años de antigüedad. Por otro lado, los primeros restos fósiles con estructura de célula se localizaron en minerales y se han datado con una antigüedad de 3.500 millones de años. Se tiene que asumir que sólo 100 a 400 millones de años fueron necesarios para que la evolución química produjera la primera estructura monocelular a partir de componentes simples inorgánicos. Los primeros organismos multicelulares no se observaron hasta 1.500 millones de años más tarde.

Cairns-Smith y Hartman (20) participantes del Grupo de trabajo «Arcillas y el Origen de la Vida», celebrado en Glasgow en 1983, sugirieron cómo las arcillas podían haber sido el origen de la vida sobre la Tierra. Esta teoría se basa en la estructura y modo de formación de estos minerales, considerados tanto productos de síntesis como de degradación o desintegración de rocas.

Las condiciones necesarias para la formación de arcillas llevadas a cabo en laboratorio coinciden con las de la naturaleza, así en medios con limitado contenido en oxígeno se forman minerales de arcilla ricos en hierro. La primitiva atmósfera Precámbrica era rica en dióxido de carbono, nitrógeno y agua, en contraste con la atmós-

fera de hoy, rica en oxígeno. En estas condiciones se pudieron formar Montmorillonitas con Fe y Nontronitas, tanto en medios lacustres y marinos como continentales.

4.2. Interacciones de los componentes del suelo

Más del 90% del N de los horizontes superficiales del suelo está en forma orgánica, y el 50% de este N está como aminoácidos procedentes de proteínas.

Las proteínas contienen una serie de grupos funcionales que pueden asociarse a las superficies de los minerales de la arcilla (21). Estos minerales presentan carga neta negativa que está neutralizada por cationes cambiabiles como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estos cationes y fundamentalmente el Na^+ ejercen un gran papel en la adsorción de proteínas por arcillas tipo esmectitas. La esmectita-Na puede intercalar proteína entre sus láminas. Se debe a la capacidad de adsorber agua por tratarse de un catión con gran capacidad de hidratación, por lo que resulta un mineral más hinchable, y por lo tanto más accesible a la entrada de grandes moléculas, como las proteínas. En el suelo es más difícil la formación de complejos esmectita-proteína interlaminares y se debe al predominio de iones calcio, siendo fácil sin embargo el acceso a la superficie externa mineral. Las proteínas son también adsorbidas en superficie por otros minerales, como vermiculitas, illitas, y caolinita, pero siempre en proporciones más bajas que en esmectitas.

Se ha observado la adsorción de aminoácidos sobre la superficie de arcillas como montmorillonitas, en solución acuosa a $\text{pH} = 7,5$, condiciones de un océano primitivo. Los cationes de las posiciones de cambio de estos minerales influyen en este proceso de adsorción (22). También la asociación de moléculas orgánicas a los grupos funcionales (SiOH y AlOH), procedentes de roturas de bordes de arcillas, pueden haber sido importantes en la química prebiótica.

4.3. Péptidos y el origen de la vida

La aparición de la vida sobre la Tierra debía ser considerada como un fenómeno inseparable, según Oparin (23), de la evolución general de nuestro planeta, aunque no se pueda reproducir artificialmente el conjunto de esta evolución. En base a los avances en conocimientos sobre geología, astronomía, biología, física y química, cuestiones relacionadas con el origen de la vida, han tomado un nuevo impulso (24). La hipótesis de la existencia de un «caldo primigenio» conteniendo todos aquellos principios químicos necesarios para la formación de biomoléculas de complejidad creciente, que finalmente darían lugar a organismos vivos, ha sido la base para reconstruir las condiciones que debería cumplir el escenario donde se formasen macromoléculas (especialmente proteínas y ácidos nucleicos), a partir de moléculas simples.

Para la mayor parte de los científicos, la vida tiene su origen en la capacidad de ciertas moléculas para autorreplicarse. Miller, basándose en las ideas de Urey (25), demostró que los aminoácidos se podían formar a partir de una atmósfera con metano, hidrógeno, amonio, agua y algún otro componente simple, bajo la influencia de descargas eléctricas y calor, lo que se podía asemejar a la «química prebiótica».

Los experimentos de Miller se repitieron bajo diferentes condiciones (distinta composición de la atmósfera, radiación ultravioleta, y otras fuentes de energía), llegando a otras moléculas precursoras como azúcares y bases nucleicas.

En las condiciones ambientales existentes al principio de la evolución química se formarían en primer lugar péptidos a partir de aminoácidos. Para explicar la evolución química de los péptidos se propuso una **catálisis mineral y reacciones de condensación** (24).

Catálisis mineral

Se define catálisis al proceso que acelera una reacción química específica hacia el equilibrio a través de una sustancia, la cual no experimenta ningún cambio químico durante el proceso. Las super-

ficies minerales pueden jugar un gran papel como catalizadores especialmente aquellos de tipo arcilla, los cuales han pertenecido a los primeros minerales formados (26-28). La actividad catalítica depende de la estructura mineral, de su química y de la reactividad de superficie.

La formación de péptidos catalizada por arcillas es una compleja combinación de varias reacciones: dimerización de aminoácidos, formación de anhídridos cíclicos y prolongación de las cadenas peptídicas.

La mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo con glicina y esmectitas (Figuras 3 y 4), poniéndose de manifiesto que la eficiencia catalítica depende de la composición de la esmectita, de la localización de la carga y del tipo de cationes intercambiables que presenta la estructura (29).

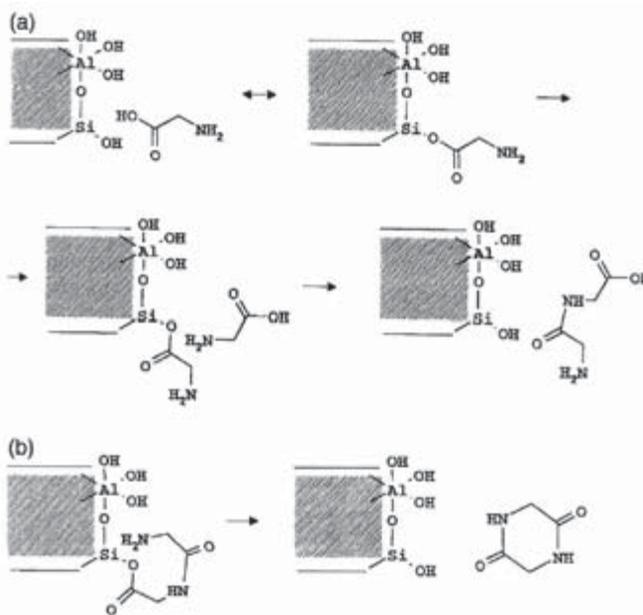


FIGURA 3. (a) Esquema de la activación de glicina en borde de una partícula de arcilla dando lugar a la formación de diglicina. (b) Esquema de la formación de dicetopiperazina (DKP) a partir de diglicina activada en borde de partícula de arcilla. Según Bujdák y Rode (30).

Bujdák y Rode (30) han trabajado con diversos tipos de minerales de arcilla para comprobar su efecto catalítico. Estudiando estos procesos con esmectitas di y trioctaédricas pudieron observar que los mejores resultados se obtuvieron con arcillas trioctaédricas, fundamentalmente con hectorita. Era dos veces menor la eficiencia obtenida con montmorillonita (esmectita dioctaédrica) y con arcillas fibrosas, atapulgita y sepiolita. La hectorita y montmorillonita se caracterizan por la distinta actividad, que puede interpretarse porque las uniones Mg-O y Li-O en la hectorita son muy polares y se facilita la orientación del aminoácido. El menor efecto catalítico fue observado con caolinita (estructura 1:1, dioctaédrica) (31).

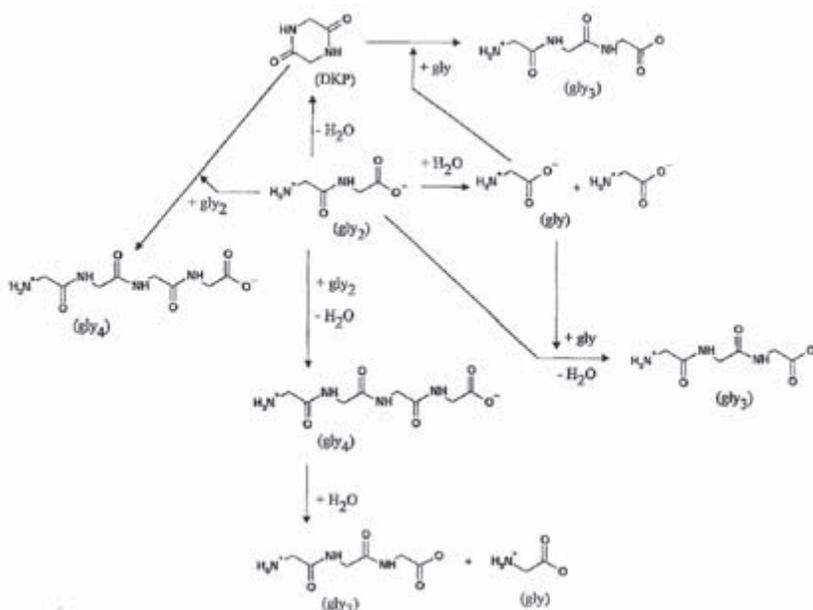


FIGURA 4. Mecanismos de las principales reacciones que tienen lugar a partir de dicetopiperazina (DKP) y glicina (gly). Según Bujdák y Rode (30).

Los minerales de la arcilla no sólo pueden catalizar la formación de péptidos a partir de aminoácidos, sino que además los protegen de procesos hidrolíticos estabilizando los compuestos formados. El mecanismo de reacción se basa en el poder de adsorción que presen-

tan en superficie los minerales silicatados y en la existencia de grupos Si-OH y Al-OH en estos minerales, como consecuencia de roturas de bordes, que pueden reaccionar con aminoácidos, de ahí su posible papel en la química de péptidos prebióticos.

Minerales fibrosos como atapulgita y sepiolita no se hinchan con el agua, pero los canales de su interior, igual que en las zeolitas, pueden adsorber agua y pequeñas moléculas de aminoácidos. Los grupos activos Si-OH están localizados en el interior de los canales debido a imperfecciones y roturas en las capas tetraédricas.

Se puso de manifiesto el efecto del pH en la formación de diglicina, observando un significativo incremento en soluciones a $\text{pH} > 7$. Una ligera acidificación disminuía la formación de uniones peptídicas. Experiencias realizadas con alanina en suspensiones de arcilla confirmaron menor reactividad que la glicina. Entre los minerales ensayados figuraba la hectorita como el más efectivo, seguido por talco, montmorillonita y en último lugar cloritas y vermiculitas. Ningún efecto se obtenía con caolinita y pirofilita (30).

Reactivos de condensación

Se ha investigado la capacidad del NaCl para actuar como agente de condensación en la formación de péptidos a partir de aminoácidos y la de iones metálicos divalentes incluyendo alcalino térreos y metales de transición. Un papel decisivo lo juega el Cu(II) como catalizador de glicina y alanina (32).

Esta reacción se denomina: Formación de péptidos inducida por sales, «Salt Induced Peptide Formation» (SIPF), representa el camino más simple para obtener péptidos en solución acuosa. Se requieren: Sistemas conteniendo aminoácidos, NaCl y una pequeña cantidad de CuCl_2 a temperatura aproximada a 80°C (33).

La pregunta es: ¿existían en los comienzos de la Tierra todos los ingredientes para esta reacción? Los aminoácidos se habrían formado en procesos atmosféricos, el cloruro sódico estaba presente en océanos y lagos y en las formaciones de rocas precámbricas se acumulaban minerales de Cu (32). La presencia de cobre en estado divalente era posible dado el contenido en oxígeno existente, según estimacio-

nes, en la atmósfera secundaria de la primitiva Tierra, capaz de transformar el Cu monovalente en Cu divalente. Las temperaturas entre 80-100° C son comunes en procesos de enfriamiento de la Tierra después de la primera formación de una hidrosfera, luego las condiciones ambientales existentes eran propicias al desarrollo de la reacción SIPF. Como resultado se obtenía que los alfa aminoácidos intervienen preferentemente en la formación de péptidos.

Rode y Suwannachot (32) llegaron a la conclusión que la reacción SIPF era la responsable de la producción de los primeros péptidos en la primitiva Tierra. Estos autores compararon y vieron la analogía entre los péptidos así formados y los encontrados en las proteínas de las membranas de los más viejos organismos vivos, las arqueobacterias. Se utilizó la glicina y alanina en presencia de montmorillonita-Ca y hectorita (33) para ver si la reacción (SIPF) y la síntesis peptídica catalizada por arcillas podían tener lugar simultáneamente bajo las condiciones primitivas de la Tierra. Los resultados mostraron que estas dos reacciones eran compatibles y por lo tanto era posible que pudieran darse juntas.

4.4. Otros minerales que actúan como agentes catalíticos

Muchos son los ejemplos en los que minerales intervienen como agentes catalíticos de diversas reacciones. La reducción de CO₂ a ácido fórmico se considera de gran interés en el origen de la vida sobre la Tierra. Esta reacción se ha llevado a cabo sobre esfalerita (ZnS) iluminando con luz UV para excitar al mineral. La hipótesis de que las primeras moléculas orgánicas para la vida se formaron por reacciones entre compuestos simples (agua, CO, CO₂) y superficies de sulfuros metálicos, como pirita, ha merecido gran atención en los últimos años (34). El N se puede reducir a amonio sobre ilmenita (FeTiO₃), anatasa (TiO₂) y esfalerita (ZnS).

5. OBJETIVOS ACTUALES DE LA CIENCIA DEL SUELO

La Ciencia del Suelo ha contribuido a través de su historia a la calidad de vida del hombre y ha aumentado nuestro conocimiento

acerca del manejo del recurso suelo en la obtención de alimentos. El incremento de la población en el mundo ha llevado a la necesidad de aumentar la producción, poniendo en cultivo gran extensión de tierras vírgenes y teniendo que aportar enmiendas, fertilizantes y pesticidas para suplir estas necesidades, lo que ha conducido a su deterioro, con pérdida de la multifuncionalidad del suelo. La consecuencia es un nuevo reto que busca el balance entre la demanda humana, el servicio del ecosistema y su integridad. Estos cambios han llevado a nuevas áreas de investigación, como calidad del suelo, desarrollo sostenible y recuperación de suelos contaminados, sin que se abandone su tradicional papel como soporte de la agricultura.

5.1. Contaminación de suelos

Se puede decir que existen muy pocos lugares en la tierra que estén libres de contaminación originada por actividades industriales. El uso en gran escala de pesticidas, lodos y fertilizantes en agricultura, que contienen metales pesados, ha conducido a la contaminación de suelos y de aguas.

Grandes esfuerzos se han realizado y muchas investigaciones son necesarias para conocer los factores que determinan la disponibilidad en el suelo de estos contaminantes y su transporte a otros compartimentos del ecosistema.

En 2005 se publica un Real Decreto por el que se establecen los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados (35) y se señala como obligatorio para cada Comunidad establecer valores de referencia para sus suelos. El comportamiento de los suelos frente al aporte de metales ha constituido otro de los objetivos llevados a cabo mediante experiencias en laboratorio, utilizando soluciones contaminantes de metales a diferentes concentraciones para determinar la Carga Crítica del suelo. Se ha analizado el papel que ejercen en la movilidad y disponibilidad de metales los minerales de la arcilla, óxidos de hierro y materia orgánica (36, 37).

5.2. Papel del suelo en el ciclo del carbono

El suelo constituye un reservorio de carbono, aproximadamente el 75% del C terrestre se encuentra en suelos, tanto en formas minerales (calcita y dolomita) relativamente estables, como en forma orgánica, constituyendo la materia orgánica la más importante reserva de C orgánico terrestre. En ciertas circunstancias, la fracción más lábil de carbono del suelo puede volatilizarse, pasando a dióxido de carbono o metano, dependiendo de los procesos de oxidación o reducción dentro del suelo. Cuando estos gases se emiten a la atmósfera contribuyen al denominado «efecto invernadero». Si bien el suelo, como sistema complejo variable, puede actuar como fuente o sumidero de gases carbonosos, va a depender su comportamiento del uso y manejo que de él haga el hombre. Por transformación de áreas con cubierta vegetal natural en zonas de cultivo la biomasa vegetativa se oxida y se convierte en CO₂; es fundamental el efecto originado por incendios forestales.

El secuestro de C por el suelo implica la fijación en forma de materia orgánica, del CO₂ tomado de la atmósfera, por las plantas (38). El contenido en arcilla controla la dinámica del C en el suelo, frenando el proceso de mineralización.

Sin embargo, el incremento de CO₂ en la atmósfera, consecuencia de actividades industriales, es lo que puede llevar al calentamiento global de la Tierra. Las estrategias que puedan conducir a mejorar este problema tienen gran significación a nivel global, ya que se desconoce la capacidad máxima de los ecosistemas para el secuestro de carbono. Las vías que proponen Mermut y Eswaran (39) son:

- a) Protección de aquellos ecosistemas capaces de retener carbono.
- b) Manipulaciones en los ecosistemas para incrementar el secuestro de carbono.

5.3. Degradación del suelo por causas físicas

Desde 1972, fecha en que se celebró en Estocolmo la Conferencia de Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Hombre, para marcar

estrategias sobre manejo sostenible del suelo, con el fin de controlar la degradación, han sido muchas las conferencias que se han celebrado con este objetivo, entre las que se pueden destacar la de Río de Janeiro, sobre Medio Ambiente y Desarrollo en 1992; la Convención de Naciones Unidas para Combatir la Desertificación en 1994, y la Convención sobre Cambio Climático en 1995.

El Centro Internacional de Información y Referencia del Suelo (ISRIC) en colaboración con FAO, ha elaborado el Mapa Mundial de degradación del suelo inducida por el hombre (40). Se identifican los siguientes tipos de intervención humana:

- a) Desforestación y pérdida de vegetación natural por incendios forestales.
- b) Sobrepastoreo por ganado.
- c) Uso inadecuado de tierras de cultivo.
- d) Sobreexplotación de la cubierta vegetal para uso doméstico.
- e) Actividades industriales que conducen a contaminación química de los suelos.

Según este Mapa Mundial, 1.964 millones de hectáreas de suelos agrícolas a nivel mundial están degradadas.

6. CONSIDERACIONES FINALES

La Ciencia del Suelo constituye una disciplina esencial para el nuevo milenio. Los importantes problemas ambientales que han tenido lugar durante las últimas décadas han contribuido a que se reconozca al suelo como el medio terrestre más complejo aún que el aire o el agua, cuya capacidad de almacenamiento de productos de deshecho de una sociedad industrializada y urbanizada, no es ilimitada. La Ciencia del Suelo en su desarrollo en el futuro tendrá que incluir aspectos relacionados con cambios climáticos globales, con el manejo de suelos en países en desarrollo, de suelos urbanos y en colaboración con otras Ciencias tendrá que responder a las demandas de la sociedad. Corresponde a los científicos del suelo jugar un importante papel demostrando el valor de esta Ciencia tanto en aspectos ambientales como en los relacionados con la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BRADY, N. C. y WEIL, R. R. (1999): The nature and properties of Soils. Prentice-Hall, Inc. USA.
- (2) SOIL SURVEY STAFF (1994): Keys to Soil Taxonomy. Soil Conservation Service. United States Department of Agriculture.
- (3) MARTÍ HENNEBERG, J. (1983): Geo-Edafología por Huguet del Villar. Geocrítica. Universitat Barcelona.
- (4) YAALON, D. H. y ARNOLD, R. W. (2000): Attitudes toward soils and their societal relevance: Then and now. *Soil Sci.* 165: 5-12.
- (5) KRUPENIKOV, I. A. (1993): History of Soil Science. Russian Translations Series 98. Balkema. A. A. (Ed.) Rotterdam.
- (6) STEVENSON, F. J. (1982): Humus chemistry. Wiley, New York.
- (7) SCHNITZER, M. (2000): A lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter. *Adv. Agron.* 68: 1-58.
- (8) PEPPER, I. L. (2000): Environmental Science: A new opportunity for Soil Science. *Soil Sci.* 165: 41-46.
- (9) SPARKS, D. L. (2001): Elucidating the fundamental chemistry of soils: past and recent achievements and future frontiers. *Geoderma.* 100: 303-319.
- (10) VAN BAREN, H.; HARTMINK, A. E. y TINKER, P. B. (2000): 75 years The International Society of Soil Science. *Geoderma.* 96: 1-18.
- (11) GRIM, R. E. (1968): Clay Mineralogy. Mc Graw-Hill, New York.
- (12) BRADY, N. C. (1990): The Nature and properties of soils, Macmillan, New York.
- (13) NEMECZ, E. (1981): Clay Minerals. Akadémiai Kiado, Budapest.
- (14) SPOSITO, G. (2000): Ion exchange phenomena. En: *Handbook of Soil Science* [Sumner, M. E., (Ed.)], pp. 241-264. CRC Press, Boca Raton, FL.
- (15) HUANG, P. M.; SENESI, N. y BUFFLE, J. (1998): Structure and Surface Reactions of Soil Particles. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry on Environmental Systems 4. John Wiley and Sons.
- (16) GREENLAND, D. J. y HAYES, M. H. B. (1978): The Chemistry of Soil Constituents, John Wiley and Sons, Chichester.
- (17) ANDREUX, F. (1987): Génesis y propiedades de las moléculas húmicas. En: *Edafología 2. Constituyentes y propiedades del suelo* (Bonneau, M. and Souchier, B., Eds.). Masson.
- (18) GIESEKING, J. E. (1975): Soil Components. VI. Organic Components. Springer-Verlag.
- (19) HANIC, F. y MORVOVA, M. (1998): Eleventh Symposium on Elementary Processes and Chemical Reactions in Low Temperature Plasma. Low Tatras, Slovakia.
- (20) CAIRNS-SMITH, A. G. y HARTMAN, H. (1988): Clay Minerals and the Origin of Life. Cambridge Univ. Press. UK.
- (21) BOYD, S. A. y MORTLAND, M. M. (1990): Enzyme Interactions with Clays and Clay-organic matter Complexes. En: *Soil Biochemistry* (Bollag, J. M. and Stotzky, G., Eds.), 6: 1-28. Marcel Dekker, Inc.

- (22) LAWLESS, J. G. (1988): Clay-organic interactions and the origin of life. En: *Clay Minerals and the Origin of Life* (Cairns-Smith, A. G. and Hartman, H., Eds.). Cambridge Univ. Press. UK.
- (23) OPARIN, A. I. (1965): L'origine de la vie sur la Terre (Gavaudan, P. and Guyot, M., Eds.). Masson y Cie.
- (24) RODE, M. B. (1999): Peptides and the origin of life. *Peptides*. 20: 773-786.
- (25) UREY, H. C. (1952): The planets. New Haven, CT: Yale University Press.
- (26) CAIRNS-SMITH, A. G. (1971): The life puzzle. Toronto. University of Toronto Press.
- (27) FERRIS, J. P.; HILL, A. R. J.; LIU, R. y ORGEL, L. E. (1996): Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. *Nature*. 381: 59-61.
- (28) HELLER-KALLAI, L.; GOLDSTEIN, T. P. y NAVROTSKY, A. (1996): Active components in clay condensates and extracts as potential geocatalysts. *Clays Clay Miner.* 44: 393-397.
- (29) BUJDAK, J.; LE SON, H. y RODE, B. (1996): Montmorillonite catalyzed peptide bond formation: The effect of exchangeable cations. *J. Inorg. Biochem.* 63: 119-124.
- (30) BUJDAK, J. y RODE, B. M. (1999): The effect of clay structure on peptide bond formation catalysis. *J. Mol. Catal. A Chem.* 144: 129-136.
- (31) BUJDAK, J.; EDER, A.; YONGYAI, Y.; FAYBÍKOVÁ, K. y RODE, B. (1996): Investigation on the mechanism of peptide chain prolongation on montmorillonite. *J. Inorg. Biochem.* 61: 69-78.
- (32) RODE, B. M. y SUWANNACHOT, Y. (1999): The possible role of Cu(II) for the origin of life. *Coordin. Chem. Rev.* 190-192: 1085-1099.
- (33) LE SON, H.; SUWANNACHOT, Y.; BUJDA, J. y RODE, B. M. (1998): Salt-induced peptide formation from amino acids in the presence of clays and related catalysts. *Inor. Chim. Acta.* 272: 89-94.
- (34) HUBER, C. y WAECHTERSCHAEUSER, G. (1997): Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe, Ni) S under primordial conditions. *Science*. 276: 245-247.
- (35) BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (2005): Real Decreto 9/2005, de 14 de enero. Criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *B.O.E.* 15: 1833-1843.
- (36) MORENO, A. M.; QUINTANA, J. R.; PÉREZ, L. y PARRA, J. G. (2006): Factors influencing lead sorption-desorption at variable added metal concentrations in Rhodoxeralfs. *Chemosphere*. 64: 758-763.
- (37) MORENO, A. M.; PÉREZ, L. y GONZÁLEZ, J. (1993): Soil Parameters Contributing to Heavy metal Dynamics in Perimetropolitan Farmland Areas. *Geomicrobiology J.* 11: 325-332.
- (38) LAL, R. (2004): Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma*. 123: 1-22.
- (39) MERMUT, A. R. y ESWARAN, H. (2001): Some major developments in soil science since the mid-1960s. *Geoderma*. 100: 403-427.
- (40) OLDEMAN, L. R.; HAKKELING, R. T. A. y SOMBROEK, W. G. (1991): World Map of the Status of Human Induced Soil Degradation: Han Explanatory Not. 2nd revised edn. ISRIC, Wageningen. The Netherlands.

Biotecnología blanca e industria farmacéutica

Recibido el 1 de marzo de 2007

JOSÉ MARÍA SÁNCHEZ MONTERO*

*Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la UCM. Grupo de Biotransformaciones.
Académico Correspondiente de la RANF*

RESUMEN

La Biotecnología blanca está relacionada con la utilización de sistemas biológicos para la fabricación, transformación o degradación de moléculas gracias a procesos enzimáticos y fermentativos. Esta definición encuadra los procesos biocatalíticos y las biotransformaciones dentro de este conjunto de disciplinas y ciencias más amplio que se ha definido como Biotecnología.

La estabilización de enzimas y células para hacerlas más resistentes a los disolventes orgánicos mediante técnicas de inmovilización y modificación así como posteriormente por ingeniería genética ha supuesto el impulso significativo para este campo. Por otra parte, el conocimiento del medio de reacción así como el control de las variables que intervienen en el proceso ha supuesto una verdadera transformación tecnológica. La Biotecnología Industrial puede ser de una gran ayuda para la obtención de medicamentos (y otros bioproductos) que son difícil o imposibles de obtener mediante métodos químicos tradicionales.

En la actualidad más de 325 millones de personas en el mundo consumen medicamentos de origen biotecnológico, de lo que se deduce que la aplicación de la Biotecnología y Biocatálisis en particular ha atravesado la frontera académica en-

* Discurso de ingreso como Académico Correspondiente.

Profesor Doctor J. M. Sánchez-Montero.

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040. Madrid.

E-mail: jsanchez@farm.ucm.es

contrando un amplio campo de acción en la Industria Farmacéutica. Los procesos biotecnológicos, por su elevada eficiencia y especificidad, cuentan entre sus propiedades más características el que generan unos menores niveles de residuos que los procesos químicos convencionales y, además, esos residuos son comparativamente mucho menos peligrosos.

Palabras clave: Biotransformaciones.—Estabilización.—Disolventes orgánicos.—Síntesis de fármacos.—Química verde.

SUMMARY

White Biotechnology and Pharmaceutical Industry

White Biotechnology is related to the utilization of biological systems for the manufacture, transformation or degradation of molecules using enzymatic and fermentative processes. This definition fits the biocatalytic processes and the biotransformations in the huge set of disciplines and sciences that have been defined as Biotechnology.

The stabilization of enzymes and cells for increasing their resistance towards the organic solvents by immobilization and modification techniques, as well as using genetic engineering, has supposed a significant impulse. On the other hand, the knowledge of the reaction media and the control of the variables affecting the process has supposed a real technological transformation. Industrial Biotechnology has become an important tool for obtaining drugs (and other bioproducts) which are difficult or impossible to obtain by chemical traditional methods.

At the present, more than 325 million people in the world use drugs with a biotechnological origin, so it can be deduced that the application of the Biotechnology (and specially Biocatalysis) has crossed the academic border finding a wide range of utilities in the pharmaceutical Industry. The biotechnological processes, due to their high efficiency and specificity, generate reduced levels of residues when compared to chemical conventional processes which on the other hand, are comparatively more dangerous.

Key words: Biotransformations.—Stabilization.—Organic solvents.—Drugs synthesis.—Green chemistry.

INTRODUCCIÓN

El interés que ha despertado la Biotecnología en estos últimos años se ha traducido, entre otras cosas, en una proliferación de definiciones consecuencia directa de su observación desde diferentes enfoques, que tienen en común el empleo de seres vivos, sus proce-

sos o productos para la obtención de beneficios mediante la modificación de éstos y la de su entorno.

Por tanto, la Biotecnología no es, en sí misma, una ciencia; es un enfoque multidisciplinar que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, ingeniería, química y medicina, entre otras) y representa una considerable diversidad de actividades industriales.

Por consiguiente podemos utilizar, como referencia, la definición de la OCDE que define la Biotecnología como: «*La aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como también a partes, productos y modelos de los mismos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimientos, bienes y servicios*» (1).

Como consecuencia de lo anteriormente dicho, la Biotecnología tiene un impacto global a tres escalas.

Este impacto es global por naturaleza, ya que al tratarse de una tecnología, puede aplicarse a una gran cantidad de áreas o sectores como son la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación, el medio ambiente, la producción industrial o la energía.

En segundo lugar, este impacto es global por alcance, pues la población demanda a lo largo de su vida atención sanitaria de calidad, así como alimentos saludables y una adecuada gestión y conservación de los recursos naturales, así como del medio ambiente.

También es global en lo que respecta al impacto que tiene sobre la economía, ya que puede considerarse como uno de los principales motores del crecimiento económico mundial, tanto en economías desarrolladas como en economías emergentes (2).

Actualmente es habitual clasificar dichas áreas de acuerdo a un código de colores con objeto de fraccionar esta complejidad que se inició con la Biotecnología roja, verde y blanca y se ha ampliado a la Biotecnología gris y azul de las cuales haremos una breve descripción (3).

- Biotecnología roja: Se refiere a las aplicaciones biotecnológicas en las áreas de salud humana y animal. Incluye tecnologías como el diagnóstico molecular, la ingeniería celular, nuevas

moléculas terapéuticas de origen biotecnológico y la terapia génica.

- Biotecnología verde: Se refiere a las aplicaciones de la biotecnología en agricultura y agroalimentación. También se incluye la investigación y obtención de plantas genéticamente modificadas como son las plantas transgénicas.
- Biotecnología blanca: Está relacionada con la utilización de sistemas biológicos para la fabricación, transformación o degradación de moléculas, gracias a procesos enzimáticos y fermentativos para aplicaciones industriales en sectores como el de los materiales, química y la energía. En estos casos, los procesos biotecnológicos se emplean como alternativa a procesos químicos convencionales, lo que conlleva ventajas económicas y medioambientales. La importancia de la biotecnología blanca para una industria más sostenible ha sido repetidamente señalada por entidades como la Comisión Europea o la OCDE, y es uno de los retos de la Plataforma Europea para la Química Sostenible.
- Biotecnología gris: Ésta se centra en las aplicaciones ambientales, creando soluciones tecnológicas sostenibles que ayudan a proteger el medio ambiente. Como ejemplo de lo dicho tendríamos la biorremediación.
- Biotecnología azul: Se refiere a las aplicaciones de la biotecnología de origen marino. Por ejemplo, búsqueda de sustancias de interés biomédico a partir de organismos marinos.

Esta clasificación por colores no consiste en una organización de una disciplina de acuerdo a criterios científicos ni técnicos, sin embargo es un sistema sencillo que ha permitido una rápida difusión.

El empleo de un biocatalizador que puede ser una enzima o una célula entera, bien en estado libre o inmovilizado para lograr una Biotransformación bajo condiciones adecuadas y con el objetivo de obtener un producto de una utilidad concreta sería objeto de estudio de la Biocatálisis.

La utilización de enzimas en Biocatálisis no se habría desarrollado si los Químicos Orgánicos no hubiesen aceptado la utilización de

estos biocatalizadores para llevar a cabo síntesis orgánicas o al menos la sustitución de pasos concretos en un proceso sintético. Este tópico de que las enzimas no podían trabajar en medios orgánicos impulsó de una manera definitiva el empleo de enzimas en síntesis orgánica.

La base de cualquier proceso biotecnológico (bioprocesos) es el uso de enzimas o células enteras, principalmente microorganismos. Podemos definir las biotransformaciones como: procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido.

La modificación genética, también conocida como tecnología de ADN recombinante, permite hacer microorganismos a medida que den mayor rendimiento de productos químicos concretos, o incluso producir productos nuevos si los genes son transferidos desde otros organismos. El incremento de la eficiencia de la reacción permite un mayor ámbito para reemplazar los procesos convencionales establecidos por otros más limpios, como la fermentación a más baja temperatura, en un ambiente aislado seguro. La naturaleza altamente específica de las enzimas significa que los productos químicos pueden producirse en una forma más pura, y que los procesos biológicos no sólo requieren menores aportaciones de productos químicos, sino que también producen flujos de residuos menores y más manejables.

Se conocen más de 2.000 enzimas, pero sólo se explotan unas 400, que se clasifican en seis categorías generales de acuerdo al *enzyme comission* (4). En su mayoría se trata de enzimas extracelulares y de origen microbiano. Las aplicaciones industriales son las que consumen el mayor porcentaje de biocatalizadores. La industria de detergentes consume el 32% del volumen total de enzimas producidos, la del almidón (15%), la industria láctea (14%) y la textil (10%). El resto se distribuye entre alimentación (cervecería, panadería, zumos, vino, sabores, grasas y aceites, piensos para animales y otros), curtidos, papel, combustibles, eliminación de residuos y diversas biotransformaciones (5). Podemos vislumbrar en este punto la importancia de las enzimas, por lo que se hace necesario describirlas aunque sea someramente.

1. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores muy potentes y eficaces de las reacciones químicas de los sistemas biológicos. Para llevar a cabo la catálisis, sustrato y enzima se acoplan de forma estereoespecífica. La enzima induce al sustrato a una configuración aproximada al estado de transición. Tanto la enzima como el sustrato sufren una alteración en su estructura por el hecho físico de la unión.

Una vez que la enzima reconoce al sustrato, éste se une al centro activo y en la tercera etapa se forman los productos.

El proceso de obtención es generalmente costoso y por tanto su recuperación del medio de reacción es esencial para que de nuevo puedan ser utilizadas, disminuyendo así los costes del proceso.

La reutilización de enzimas implica como paso previo la estabilización del biocatalizador, existiendo diversas técnicas para conseguirlo entre las que citaremos:

- a) Inmovilización de enzimas.
- b) Modificación química.
- c) Ingeniería proteica por mutagénesis dirigida.
- d) Ingeniería del medio de reacción.

1A. Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un proceso por el cual confinamos físicamente a una enzima o célula en una determinada región del espacio, de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizada.

El tener la enzima unida a una matriz sólida (enzima inmovilizada), insoluble en el medio de reacción, facilita que al final de la reacción pueda ser fácilmente recuperada y sometida a repetidos usos, lo que permite, además, que la disolución final no contenga la proteína indicada. Muchas veces, la simple unión a la citada matriz puede también aumentar la estabilidad de la enzima.

Este proceso conlleva una serie de ventajas entre las que citaremos algunas desde el punto de vista de su aplicación ya que:

- Se produce un gran aumento de la estabilidad de la enzima o célula inmovilizada.
- Se aumenta la productividad enzimática por la capacidad de reutilización.
- Se aumenta la facilidad de recuperación y purificación de los productos.
- Se aumenta la facilidad de operación y control del proceso, al trabajar en condiciones más suaves.

Pero también algunas desventajas entre las que citaré:

- Generalmente se disminuye la actividad enzimática.
- Se aumentan los problemas difusionales.
- Se aumentan los costes del proceso.

La inmovilización de enzimas es una técnica de gran interés desde el punto de vista industrial, ya que permite el uso continuado en la síntesis de un determinado producto, existiendo una gran cantidad de bibliografía sobre este tema (6-7). Dentro de las estrategias de inmovilización de enzimas o células podemos diferenciar los métodos químicos y físicos (Figura 1).

En los métodos químicos esta unión se lleva a cabo mediante enlaces covalentes a grupos activados de la matriz sólida. El entrecruzamiento intermolecular de la enzima mediante reactivos bifuncionales puede dar lugar a incrementar la insolubilidad del catalizador en el medio de reacción. Esta estrategia también se puede utilizar mediante el entrecruzamiento entre distintas moléculas de proteína o por copolimerización de la enzima modificada con un monómero insaturado en un gel de estructura tridimensional.

En general la unión a soportes mediante métodos físicos puede conseguirse mediante interacciones iónicas (adsorción), fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals, etc. Por otra parte, ciertos polímeros naturales, celulosa, colágeno y otros, forman geles, en cuya estructura tridimensional la enzima puede quedar ocluida o confinada en

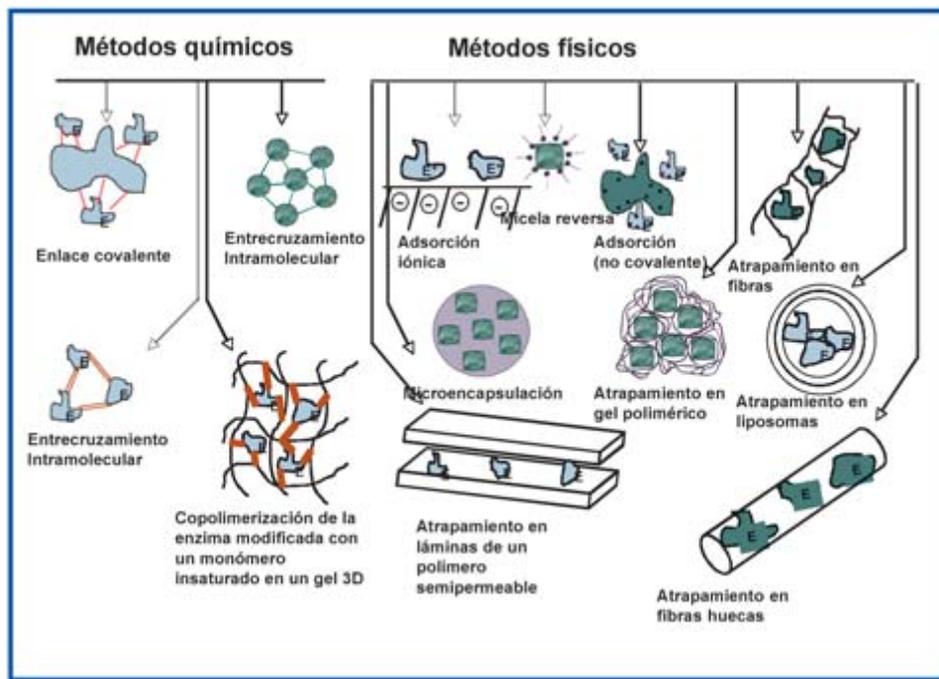


FIGURA 1. *Métodos de inmovilización de enzimas y células.*

microcápsulas de un polímero orgánico, o retenida en las fibras huecas de una membrana polimérica o en láminas de un polímero semipermeable.

La inmovilización química es una técnica muy versátil ya que permite la unión de una enzima o célula sobre una gran cantidad de soportes que pueden ser de origen orgánico e inorgánico e incluidos en estos dos grandes grupos se encuentran también una amplia gama de soportes que pueden ser naturales o artificiales. Dentro de esta última categoría prácticamente se pueden diseñar un soporte y una metodología química específica según el tipo de unión que nos interese llevar a cabo.

En la mayor parte de las ocasiones la unión entre la enzima y el soporte no puede hacerse de forma directa, por lo que será necesario el concurso de otra molécula que actúe de puente de unión entre la enzima y el soporte, existiendo numerosas metodologías disponibles a este fin (8-9).

1B. Modificación química

La modificación química consiste en la unión de una molécula de tamaño variable en la superficie de una enzima a través de un residuo aminoacídico modificando alguna propiedad de la enzima. En función de las características de la molécula que se introduce se puede aumentar la superficie hidrofílica o hidrofóbica de la enzima. La funcionalización puede llevarse a cabo utilizando diversas estrategias, entre las que podemos citar la unión vía *p*-nitrofenilcloroforniato, triclorotriazina, etc. (Figura 2). La utilización de triclorotriazina permite la inclusión de dos moléculas de PEG por residuo aminoacídico (10).

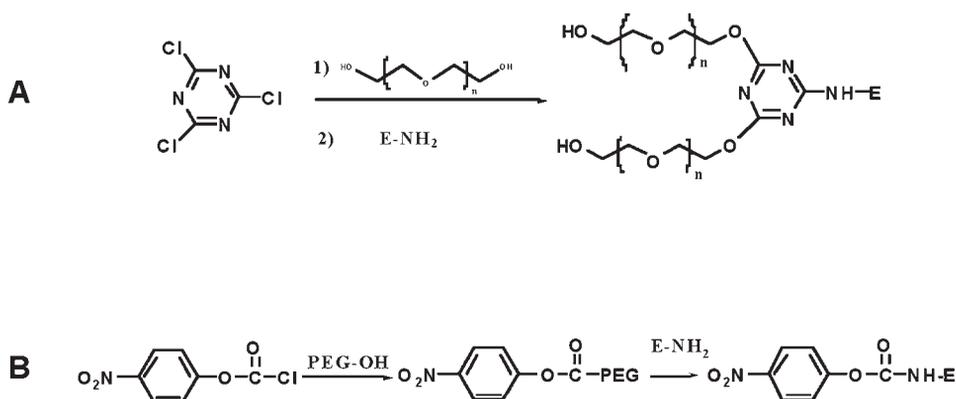


FIGURA 2. *Métodos de modificación química de enzimas.*

A) Vía triclorotriazina. B) Vía *p*-nitrofenilcloroforniato.

1C. Ingeniería de proteínas

Otra estrategia de estabilización es la ingeniería de proteínas que básicamente consiste en la modificación de la funcionalidad de las proteínas o creación de nuevas funcionalidades haciendo los procesos biocatalíticos más económicos y eficientes. Esto puede realizarse desde dos aproximaciones. Podemos intentar la *síntesis de novo* de proteínas por métodos químicos, o bien podemos modificar las proteínas ya existentes. En este caso el procedimiento consiste en la

sustitución de un aminoácido en una proteína, mediante el reemplazamiento artificial de un nucleótido en el gen que codifica la proteína. El procedimiento se denomina mutagénesis dirigida.

Este DNA modificado puede luego insertarse en una célula receptora y seleccionar mutantes que se diferenciarán del tipo silvestre por el cambio introducido en ese sitio específico. Como ejemplo de lo anteriormente dicho tendríamos las siete modificaciones realizadas en la amilasa maltogénica de *Thermus species* cepa IM6501: Mediante estas mutaciones se consiguió aumentar la temperatura óptima de reacción en 15° C, por lo que pasó de operar de 60 a 75° C (11).

Como hemos visto, los avances en la modificación estructural de las enzimas permiten la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas hechas a la medida de las necesidades.

1D. Ingeniería del medio de reacción

La ingeniería del medio de reacción se basa en el diseño de las condiciones adecuadas para que una enzima pueda catalizar una reacción química en cualquier medio, ya sea el convencional (agua), o no convencional (disolventes orgánicos, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, o sin disolvente), en sus niveles de máxima actividad y estabilidad.

La mayoría de los biocatalizadores son capaces de catalizar una reacción en ambas direcciones. Las enzimas no son las que determinan la dirección en la que transcurre la reacción, cuestión que solamente se establece por las condiciones de reacción y la posición del equilibrio. De ahí que enzimas como las hidrolasas, que en medio acuoso catalizan reacciones de hidrólisis, cuando se colocan en medios con bajo contenido en agua puedan catalizar las reacciones inversas a la hidrólisis y de transferencia de grupos (Figura 3).

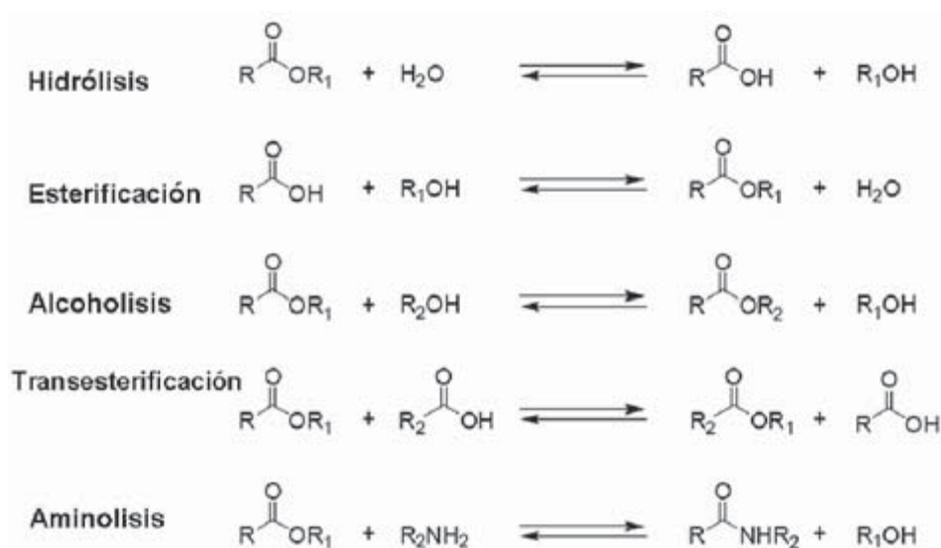


FIGURA 3. *Reacciones de hidrólisis, síntesis y de transferencia de grupos catalizadas por las lipasas.*

Los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo (12-15) han demostrado que en el caso de las hidrolasas y más concretamente las lipasas pueden llevar a cabo reacciones inversas a la hidrólisis. Para mantener la actividad enzimática parece ser que se necesita de una mínima cantidad de agua. Esta cantidad es a veces considerablemente menor que una monocapa de agua alrededor de las moléculas de enzima. El resto del medio puede ser el disolvente no convencional, lo que equivale a trabajar con la enzima con una cantidad de agua superior a la que corresponde al agua de cristalización.

Estas moléculas de agua actuarían como un lubricante frente al disolvente manteniendo intacta la estructura de la proteína tal como se indica en la Figura 4. El *grado de hidratación* de la enzima es el parámetro clave. La determinación de la cantidad de agua necesaria para cada enzima se puede llevar a cabo mediante su isoterma de adsorción de agua. En principio el agua se une a los sitios ionizables de la proteína. Cuando añadimos más agua, ésta se une a los sitios polares y cargados y posteriormente se alcanza la monocapa de agua, hasta que finalmente la enzima muestra propiedades termodinámicas en disolución.

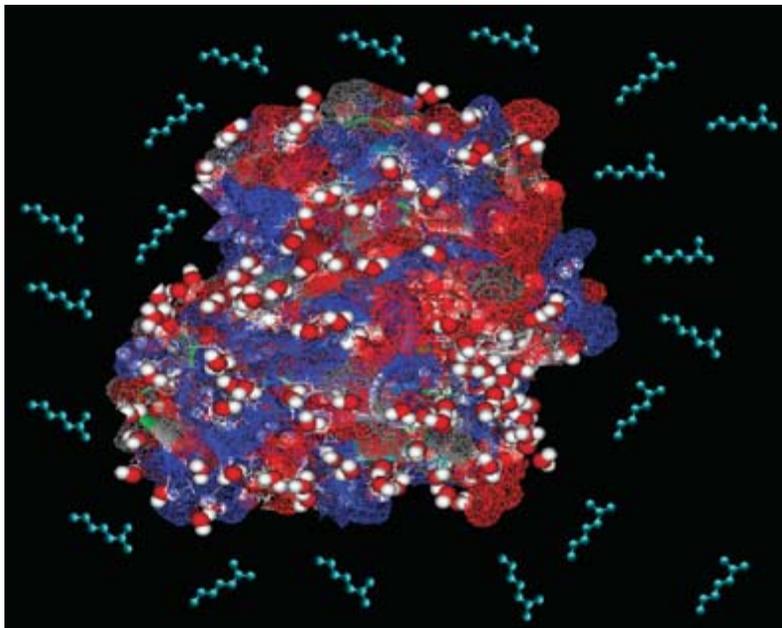


FIGURA 4. *Simulación de la lipasa de Rhizomucor miehei en un medio de reacción orgánico con la monocapa de agua esencial y moléculas de isooctano como disolvente.*

Cuando el sistema está compuesto por diferentes fases, el agua se distribuye entre las distintas fases presentes. Parte del agua se une a la enzima, otra parte se disuelve en el disolvente y una tercera en el soporte, u otras sustancias presentes en el medio de reacción hecho por el cual es muy importante realizar la isoterma en las mismas condiciones en las que va a discurrir la reacción.

Normalmente, la actividad enzimática aumenta con el incremento de la hidratación de la enzima, lo que se explica por la acción «lubricante» del agua sobre la flexibilidad interna de la proteína. A una determinada cantidad de agua existe un máximo en la actividad enzimática.

El diseño del medio de reacción incluye la variación de condiciones diferentes a las de la propia naturaleza del disolvente, como la presión, la temperatura y la presencia de aditivos.

2. SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA

La Biotecnología Industrial puede ser de una gran ayuda para la obtención de medicamentos (y otras bioproductos) que son difícil o imposibles de obtener mediante métodos químicos tradicionales. Gran parte de los principios activos farmacéuticos son moléculas que presentan dentro de su estructura química centros quirales, de cuya correcta configuración depende su bioactividad. Los procesos de síntesis química se caracterizan en general por la obtención de mezclas de isómeros, que son además difíciles de purificar. En este sentido, los procesos biocatalíticos presentan una gran ventaja, ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles, que se obtendrá de forma enantiopura. Para ilustrar esta idea sólo tenemos que retrotraernos al triste caso de la talidomida en la que el enantiómero S presenta una actividad sedante y el R es teratogénico aunque encontramos muchos otros ejemplos de este comportamiento entre los que podemos citar la (*S*)-penicilamina que tiene actividad antiartrítica y la (*R*)-penicilamina, que es tóxica, entre otros. La diferente actividad farmacológica de los dos isómeros ópticos hicieron que la Agencia Europea del medicamento así como la FDA americana sólo acepte desde el año 1992, el isómero que posee actividad farmacológica imponiendo severas restricciones en el caso de mezclas racémicas. Debido a estas dificultades, la industria farmacéutica sólo desarrolla compuestos óptimamente puros. Cabe indicar en este sentido que de los diez medicamentos más vendidos en España, siete son compuestos óptimamente activos entre los que citamos al enalapril, paroxetina, atorvastatina, dudesamina, fluoxetina, salmeterol y diltiazem. En la obtención de estos fármacos se ha usado una biotransformación en algún paso.

En los casos en que no sea posible obtener directamente los principios activos mediante procesos de biocatálisis, esta tecnología podrá permitir la obtención de ciertos precursores imprescindibles para la posterior síntesis química del principio activo final.

3. EL SECTOR BIOTECNOLÓGICO Y LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las compañías farmacéuticas encuentran cada vez más difícil desarrollar y sacar al mercado nuevos productos. El número de fármacos aprobados cada año ha disminuido desde 1996, mientras que los gastos de I+D han aumentado enormemente. Este es uno de los motivos fundamentales por el que las empresas farmacéuticas buscan alianzas con las empresas biotecnológicas. Esta falta de nuevos fármacos ha llevado a que el sector farmacéutico haya sido acusado de realizar demasiadas copias de medicamentos ya existentes, que sólo añaden ligeras ventajas clínicas. Debido a ello muchas empresas farmacéuticas están dirigiendo su atención hacia las pequeñas compañías del sector biotecnológico como fuente de innovación constante en el desarrollo de nuevos fármacos (16).

En la actualidad más de 325 millones de personas en el mundo consumen medicamentos de origen biotecnológico. En EE.UU., el número total de este tipo de fármacos autorizados asciende a más de 170, el 70% de los cuales han sido autorizados durante los últimos seis años. En la actualidad se encuentran en fase de desarrollo más de 370 biomedicamentos para consumo humano, para combatir más de doscientas enfermedades. Atendiendo a la función terapéutica, 178 se dirigen a combatir el cáncer y enfermedades relacionadas con el cáncer, 47 se centran en la lucha contra enfermedades contagiosas, 26 están relacionados con alteraciones en el sistema inmunológico y 22 contra enfermedades neurológicas. Otros fármacos combatirán la diabetes, las alteraciones digestivas, los problemas cardiovasculares y alteraciones respiratorias entre otros.

De todo lo dicho anteriormente puede concluirse que la aplicación de la Biocatálisis ha atravesado la frontera académica, encontrando un amplio campo de acción en la industria farmacéutica aunque su aportación representa solo una parte de la producción de fármacos por métodos biotecnológicos.

4. APLICACIONES DE LAS BIOTRANSFORMACIONES EN LA PREPARACIÓN INDUSTRIAL DE FÁRMACOS

4.1. Síntesis de omapatrilato

El omapatrilato es un fármaco antihipertensivo que actúa como inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina y de la endopeptidasa neutra (17). Para su síntesis se siguió una estrategia convergente (Ruta 1) para la que se requieren dos intermedios la (S)-6-hidroxinorleucina y el ácido (S)-2-amino-5-(1,3-dioxolan-2-il)pentanoico, los cuales se prepararon por rutas biocatalíticas independientes.

El primer intermedio se preparó mediante una aminación reductora, usando la glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (Método A) (18) a partir de una concentración de sustrato de 100 g/L, obteniéndose un rendimiento del 92% y un exceso enantiomérico mayor del 99%. Este procedimiento presenta el inconveniente de que la preparación del sustrato de partida requiere de varios pasos de síntesis química por lo que se desarrolló otra ruta (Método B) a partir de la 6 hidroxinorleucina racémica (método B), tratando ésta con una D-aminoácido oxidasa de riñón porcino y catalasa de hígado de bovino o con células de *Trigonopsis variabilis* (contiene ambas enzimas) produciendo la mezcla de (S)-6-hidroxinorleucina con un ee mayor del 99% y el cetoácido que se indica en la Figura 5.

El segundo intermedio fue preparado a partir de la aminación reductora mostrada en la ruta 2, usando un biocatalizador obtenido mediante una cepa recombinante de *Pichia pastoris* conteniendo la fenilalanildeshidrogenasa endógena. El proceso resultó con la producción de 15,5 kg con 97% de rendimiento y un ee mayor del 98%. Hay que mencionar que por vía química se requieren ocho pasos para la obtención de este intermedio (19). El cetal cíclico fue transformado al dimetilacetal el cual se usó para la preparación del compuesto bicíclico, como se muestra en la ruta 3.

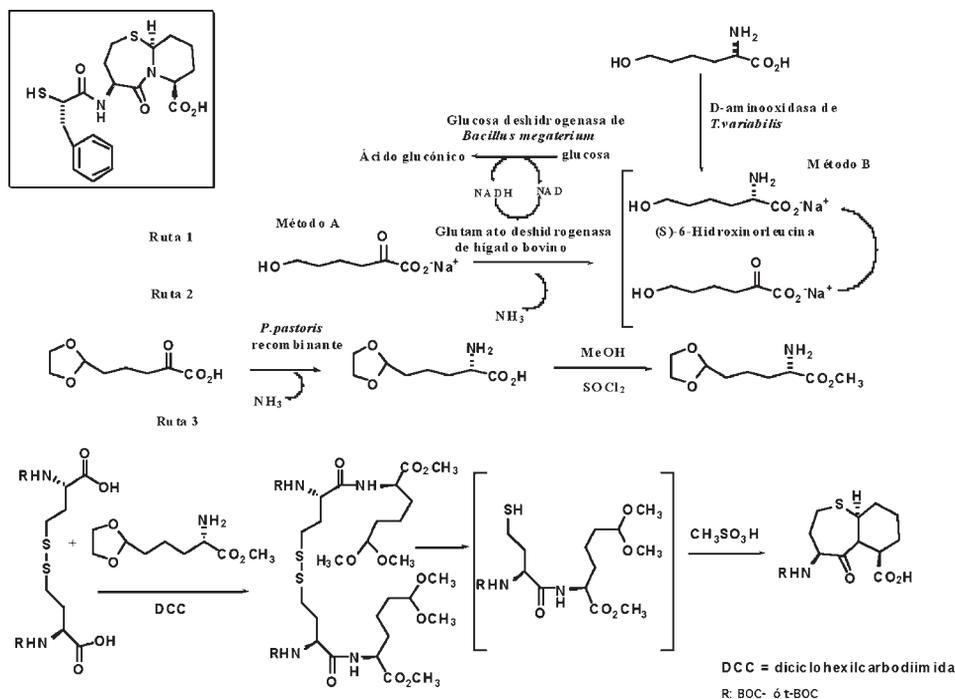


FIGURA 5. Síntesis enzimática de omapatrilato.

4.2. Preparación de Tromboxano A₂

El tromboxano A₂ es un vasoconstrictor con actividad antiagregatoria de plaquetas por lo que la preparación de compuestos antagonistas del tromboxano presenta un gran interés para la industria farmacéutica (Figura 6).

En un estudio para la preparación de tromboxano se encontró que la lactona y el lactol son intermedios versátiles para una serie de derivados que condujeron a la obtención del compuesto antagonista del tromboxano A₂ (20, 21). La oxidación biocatalítica del diol *meso* (*exo,exo*)-7-oxabicyclo [2,2,1]heptan-2,3-dimetanol utilizando una suspensión de células húmedas al 10% (p/v) de *Nocardia globerula* ATCC221505 produjo la lactona con un rendimiento del 70% y 96% de ee, a una concentración de sustrato de 5 g/L (22, 23). Por otro

lado, partiendo del mismo sustrato y a la misma concentración inicial se obtuvo una mezcla del lactol y la lactona con un 46% de rendimiento global utilizando una suspensión de células de *Rhodococcus sp.* ATCC15992 con un ee del 96,7% y 98,4% respectivamente.

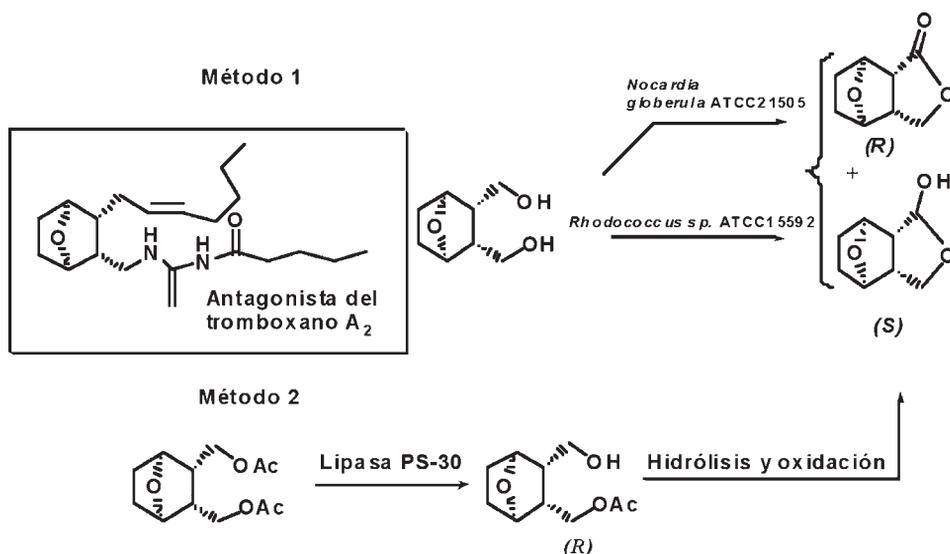


FIGURA 6. *Preparación de Tromboxano A₂*.

En otra estrategia sintética (Método 2) partiendo del mismo diol meso se empleó una reacción de asimetrización enzimática de su diéster. Con este propósito se preparó el diacetato, el cual, sometido a una posterior hidrólisis con la lipasa inmovilizada PS-30, produjo el monoacetato de configuración S con un rendimiento del 75% y un exceso enantiomérico superior al 99%, empleando un sistema de reacción bifásico y a una concentración de sustrato de 5 g/L. La enzima inmovilizada se reutilizó durante cinco ciclos sin pérdida de eficiencia ni estereoselectividad. El monoacetato fue entonces convertido al lactol vía hidrólisis y oxidación química (24).

4.3. Modificación biocatalítica del Diltiazem

El Diltiazem, utilizado para el tratamiento de la hipertensión, presenta como mayor inconveniente su corta vida media, por lo que se han buscado modificaciones estructurales para solucionar este problema, siendo esta una estrategia muy común en Química Farmacéutica (Figura 7).

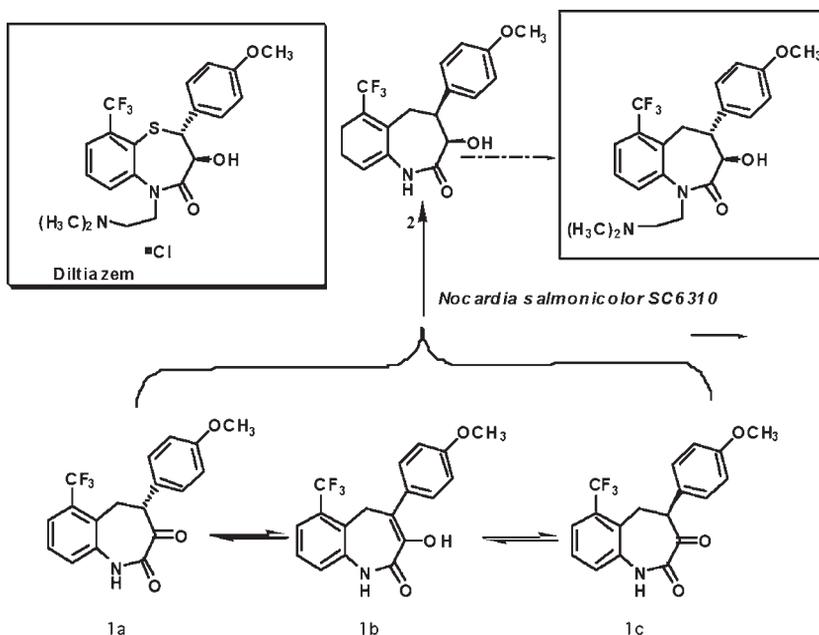


FIGURA 7. Preparación biocatalítica de Diltiazem.

Dicha modificación condujo al compuesto (cis)-3-(acetoxi)-1-[2-(dimetilamino)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-4-(metoxifenil)-6-trifluorometil)-2H-1-benzazepin-2-ona el cual, además de presentar un efecto más prolongado es más potente. El intermedio clave en la síntesis de este compuesto es el que aparece en la Figura 7 con el número 2, el cual fue preparado mediante una reducción microbiana estereoselectiva del compuesto marcado como 1 que a su vez se encuentra como una mezcla de enantiómeros a través de una tautomería cetónica. En dicho equilibrio la forma cetónica racémica 1a y 1c es

la preferida. El microorganismo *Nocardia salmonicolor* SC6310 es capaz de biocatalizar la transformación selectiva de **1c** a **2** con un 96% de rendimiento y 99,8% de ee a una concentración de sustrato de 2 g/L (25).

4.4. Preparación enantioselectiva del (*R*)-Sotalol

El (*R*)-Sotalol es un β -bloqueante con estructura de feniletilamina (Figura 8).

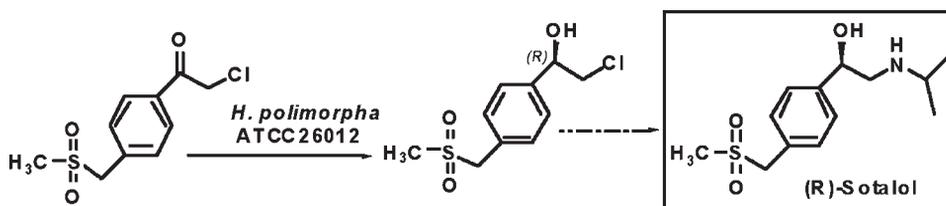


FIGURA 8. Preparación enantioselectiva de (*R*)-Sotalol.

Se comercializa con el nombre de Sotapor[®] por la compañía Bristol - Myers Squibb, habiéndose determinado que el enantiómero *R* es 50 veces más potente que el *S* y por tanto se ha propuesto a la clorhidrina como un precursor apropiado para la preparación enantioselectiva del (*R*)-sotalol. Se encontró que *Hansenula polymorpha* ATCC26012 cataliza la reducción enantioselectiva del carbonilo, produciendo el intermedio con la configuración (*R*) deseado en un 95% de rendimiento y con un exceso enantiomérico del 99% (26, 27).

4.5. Síntesis de análogos de Fluvastatina

Otro ejemplo de reducción enantioselectiva nos muestra como el 4-cloro-acetoacetato de metilo es biotransformado al ácido (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-butanoico a partir de una suspensión de células de *Geotrichum candidum* SC5469 con un 95% de rendimiento y un 96% de ee (Figura 9).

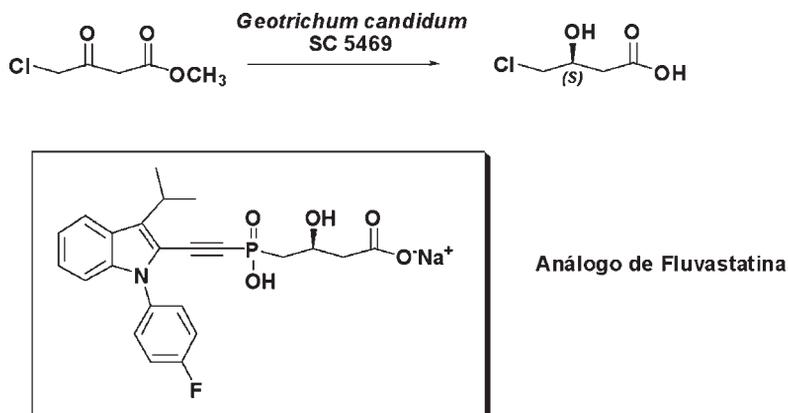


FIGURA 9. *Obtención del ácido (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoico como intermedio en la síntesis de Fluvastatina.*

El hidroxiéster quiral ha sido utilizado para sintetizar el compuesto final, el cual es un inhibidor de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa, análogo de la fluvastatina que se utiliza como hipolipemiante. La optimización del proceso mediante el aislamiento, purificación e inmovilización de *Geotrichum candidum* condujo a la obtención del intermedio con un 90% de rendimiento y un 98% de ee (28).

4.6. Acilación de Purina

Un buen ejemplo de quimio y regioselectividad combinada de una transformación enzimática es la acilación de purina (506U78) que comenzó siendo desarrollada por Glaxo Wellcome, como un agente antileucémico (Figura 10).



FIGURA 10. *Acilación de purina.*

Usando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B y acetato de vinilo como donador de acilo se obtuvo el 5'-monoacetato con un 99% de conversión. El compuesto obtenido es más soluble por lo que aumenta la biodisponibilidad. Esta transformación es prácticamente imposible de realizar por una acetilación química convencional debido a la conocida preferencia por la N-acilación. La regioselectividad del proceso es remarcablemente alta ya que se obtiene menos del 0,1% del del 3'-acetato y aproximadamente un 0,3% del 3,5'diacetato (29).

4.7. Tamiflu

A veces es interesante sobre expresar enzimas existentes en un microorganismo en orden a acumular ciertos productos como mostramos en el siguiente ejemplo. El fosfato de oseltamivir, un inhibidor de la neuroaminidasa A conocido como Tamiflu® es un fármaco para el tratamiento del virus de la gripe A y B comercializado por Hoffmann-la Roche y Gilead Sciences.

A pesar del pequeño tamaño de la molécula ésta contiene tres centros quirales y es bastante difícil de sintetizar. De todas las rutas de síntesis ensayadas se ha concluido que el ácido quínico y el ácido shikímico son los precursores más adecuados (Figura 11). El ácido quínico puede ser obtenido en grandes cantidades de la corteza del árbol de la *Cinchona* pero no se tiene la certeza de si sería una fuente fiable a largo plazo para la obtención de un fármaco del que se espera una gran demanda (30). Del árbol del anís estrellado, una especie originaria de China, Corea y Japón se extrae el ácido shikímico el cual es un intermedio en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La sobreexpresión e interrupción de algunos genes alrededor de la síntesis y posterior conversión de ácido shikímico en *E. coli* nos lleva a la acumulación del ácido shikímico en el medio de cultivo (20 g/L), mientras que la producción de ácido quínico podría ser suprimido (31).

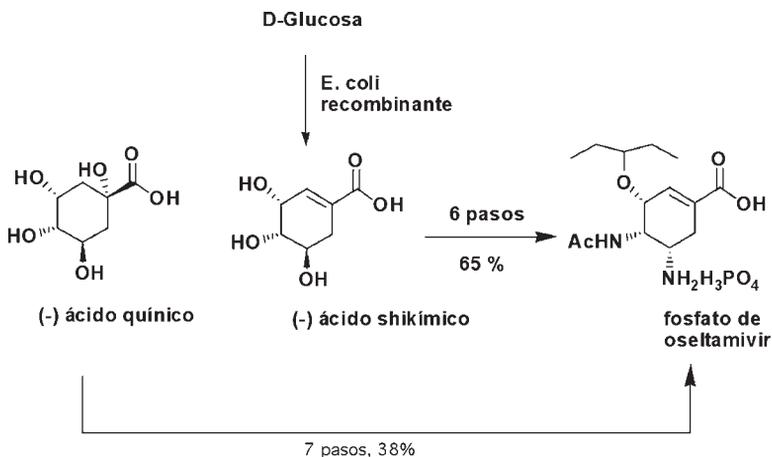


FIGURA 11. *Producción de fosfato de oseltamivir (Tamiflu).*

4.8. Síntesis quimioenzimática de Acipimox

Para llevar a cabo la síntesis del ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico, el cual se usa como intermedio para la producción de Acipimox cuyo nombre comercial es el olbetam de la laboratorios Pfizer que se utiliza como antilipolítico y de la glipizida (glucotrol), que es un agente antidiabético, se sometió a la 2, 5-dimetilpirazida a oxidación con *Pseudomonas putida* crecida en xileno (Figura 12).

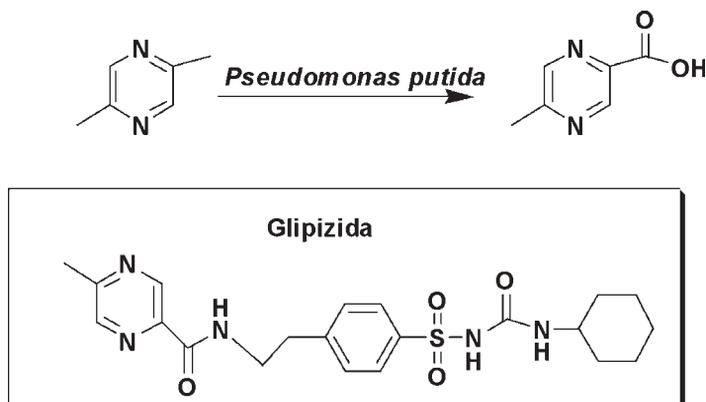


FIGURA 12. *Síntesis enzimática del ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico, intermedio en la obtención de Acipimox.*

El producto se precipita por acidificación del medio de reacción libre de células. La concentración de sustrato puede alcanzar hasta 2 g/L con un rendimiento del 95% (32).

4.9. Síntesis de (3R, 4S) acetato de azetidionona (Taxol)

La (3R, 4S) acetato de azetidionona (33) es un intermedio en la síntesis de paclitaxel (taxol) la cual se obtiene por resolución del racémico utilizando una lipasa inmovilizada de *Pseudomonas cepacea* (34). El taxol es un medicamento empleado para tratar algunos tipos de cáncer por su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales. La principal fuente de obtención natural es el árbol del tejo *Taxus brevifolia* que contiene taxol en muy bajas concentraciones. Una alternativa semisintética a partir del diterpeno tetracíclico 10-deacetil baccatina III se muestra en la Figura 13a.

Otra estrategia consiste en la preparación de biocatalizadores activados por sales para sintetizar derivados de paclitaxel (taxol) (35). La proteasa termolisina acila selectivamente el grupo hidroxilo 2' en el taxol en alcohol tertamílico como disolvente (Figura 13b).

Los rendimientos de los derivados acilados en esta posición se aproximan al 100% utilizando una termolisina activada con KCl. El adipato de vinilo generado en la posición 2' sirvió como donador de acilo para la hidrólisis catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* sobre el éster vinilo terminal. El compuesto resultante fue aproximadamente 1.700 veces más soluble en agua que el taxol de partida, lo que pone en evidencia la importancia de profármacos de taxol con una mayor biodisponibilidad.

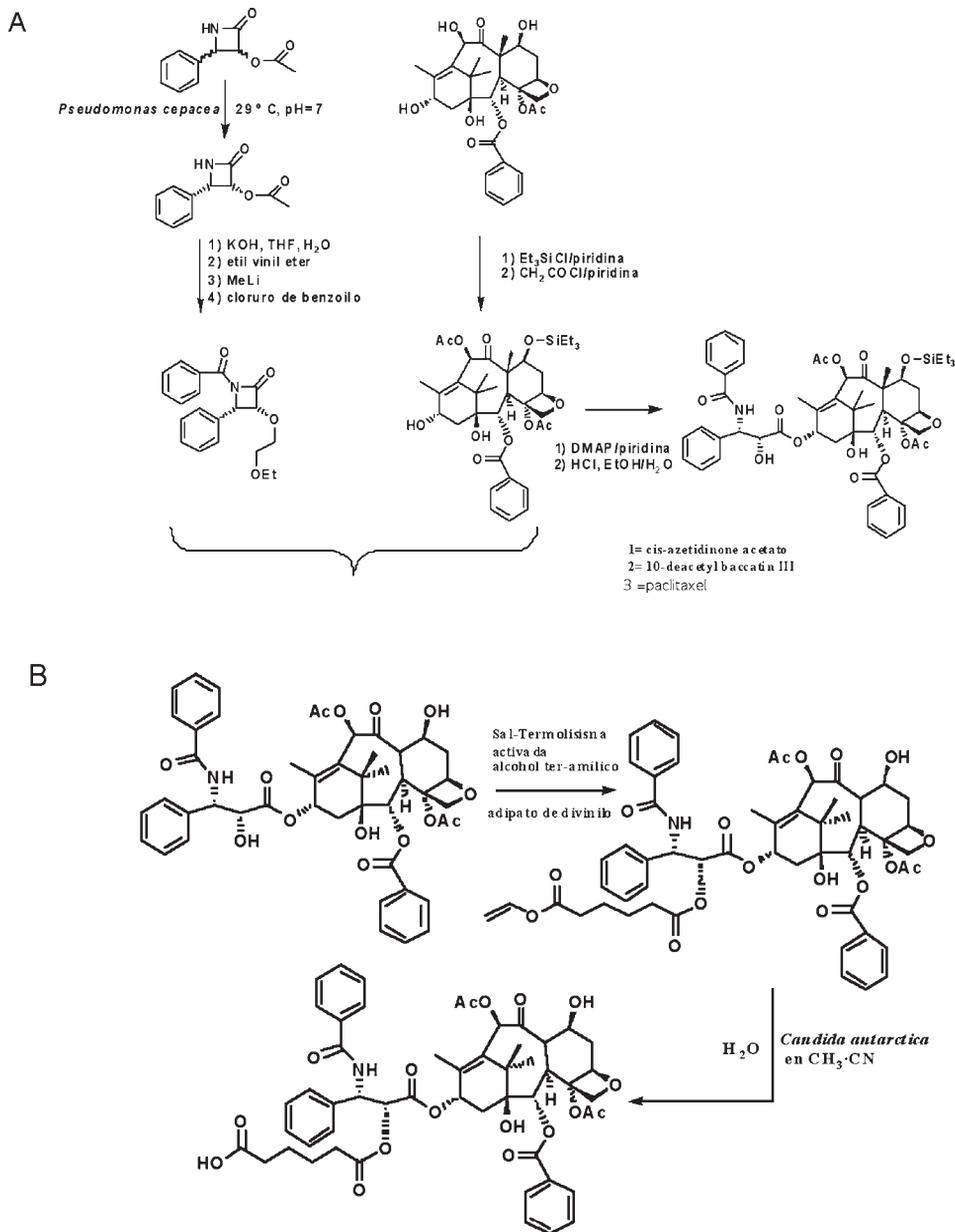


FIGURA 13. **A)** Resolución enzimática de acetato de azetidinona, intermedio de la síntesis de Taxol. **B)** Preparación de biocatalizadores activados por sales para sintetizar derivados de taxol.

4.10. Síntesis de (S)-pipecólico (Incel, Ropivacaina y Lebobupivacaina)

El ácido (S)-pipecólico es un intermedio importante en la síntesis de varios fármacos entre ellos el Incel [dicitrato de Biricodar (VX-710)] de la compañía Vertex Pharmaceutical que se utiliza en terapia combinada con paclitaxel para el tratamiento del cáncer (36). También a partir del ácido (S)-pipecólico se pueden obtener los anestésicos locales Ropivacaina utilizado como anestesia epidural en el parto y Lebobupivacaina comercializados por la empresa Astra Zeneca (Figura 14).

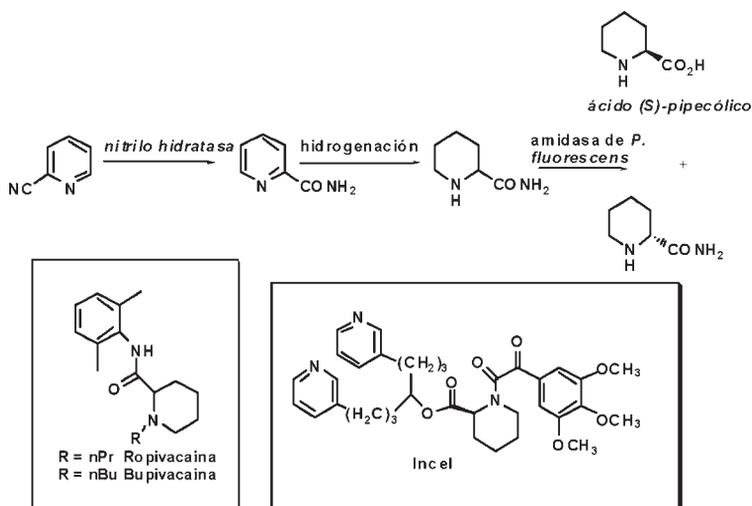


FIGURA 14. Síntesis quimioenzimática de ácido (S)-pipecólico.

La producción de este intermedio se lleva a cabo de forma eficiente por la compañía Lonza, mediante una combinación de métodos químicos y biotecnológicos. En el primer paso biocatalítico, células de un microorganismo, que contiene una nitrilohidratasa, llevan a cabo la hidrólisis de la 2-cianopiridina, produciendo la piridin-2-carboxamida, la cual por reducción química produce la amida racémica. En el segundo paso biocatalítico, células de *Pseudomonas fluorescens* DSM9924 efectúan la hidrólisis enantioselectiva del grupo amido, produciendo el ácido (S)-pipecólico y la amida (R).

4.11. Producción de L-carnitina

Un ejemplo impactante de lo que pueden hacer los procesos biocatalíticos es la producción de la L-carnitina (37) (Figura 15).

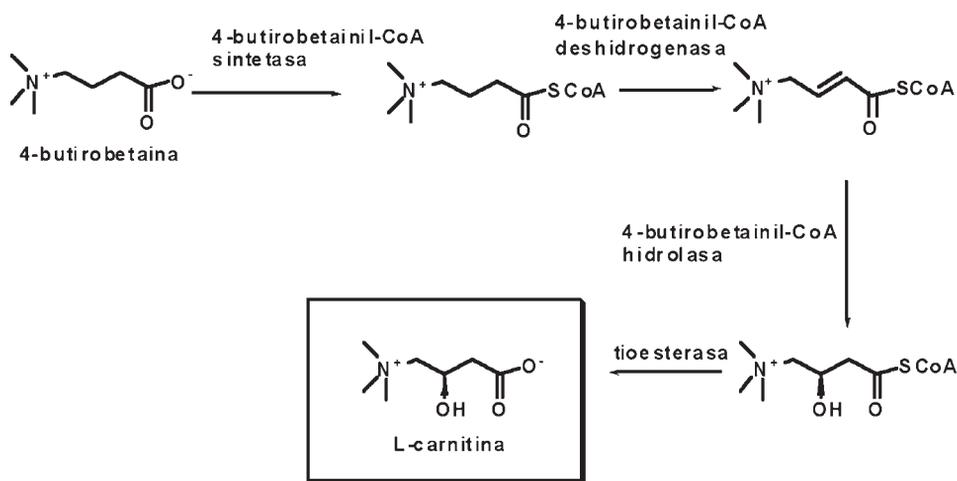


FIGURA 15. *Producción biocatalítica de L-carnitina.*

En medicina cardiovascular, la L-carnitina es fundamental en el correcto funcionamiento del corazón, por lo tanto es recomendada ante situaciones de insuficiencia cardiaca, anginas de pecho, secuelas de infarto, etc., debido a que este suplemento dietético favorece la contracción de las células musculares cardiacas. Es un vasodilatador y antioxidante a la vez.

El proceso se lleva a cabo utilizando células de un microorganismo, el cual utiliza una ruta natural que involucra cuatro enzimas. En este proceso la 4-butirotetaina se transforma a L-carnitina, la cual es excretada por las células al medio facilitando su aislamiento. El microorganismo utilizado está relacionado con los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* y se utilizó en el proceso en su fase de crecimiento estacionaria. Como se observa en la Figura 15, las cuatro enzimas tienen una función particular, mencionando especialmente la introducción de la quiralidad por la liasa, crotonobetainil-coenzima A hidrolasa. Bajo este procedimiento se produce L-carnitina a

una escala de 50 m³ con un rendimiento volumétrico de 80 g/L, y con una conversión del 99,5% y un ee mayor del 99,9%.

4.12. Semisíntesis de Yondelis

Otro ejemplo interesante es la semisíntesis de Yondelis. Este es un antitumoral desarrollado por PharmaMar, aislado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata*, que actualmente se encuentra pendiente de registro. Es un antitumoral activo frente a sarcomas de tejidos blandos (38).

Tiene un mecanismo de acción único que implica la unión al surco menor del ADN y formación de un aducto covalente. El proceso de síntesis total fue llevado a cabo por Corey et al. utilizando un proceso de mas de 40 pasos esterocontrolados.

Los investigadores de PharmaMar han desarrollado un proceso nuevo de producción en 18 etapas utilizando cianosafracina B como producto de partida (39) (Figura 16).

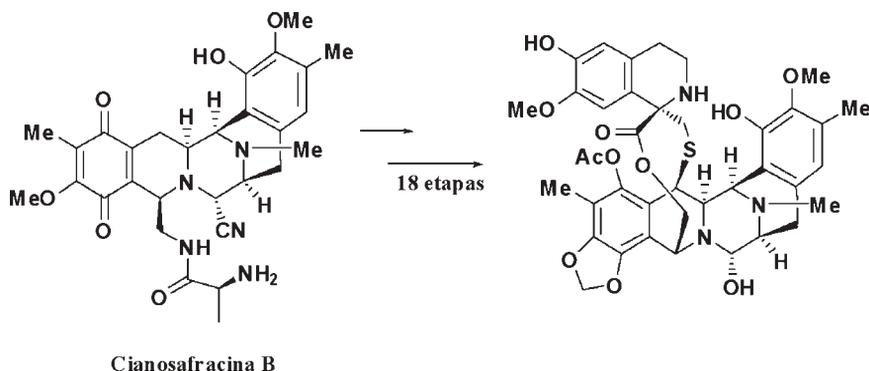


FIGURA 16. *Semisíntesis de Yondelis.*

La Safracina B es un antiobiótico de origen bacteriano aislado en la fermentación de *Pseudomonas fluorescens*. La optimización del proceso de fermentación ha permitido la síntesis del ciano derivado en escala de Kg, produciendo material de partida para la síntesis de Yondelis en un proceso robusto, sofisticado y barato.

4.13. Producción de antibióticos β -lactámicos

La biotecnología es la principal herramienta también para la obtención de nuevos antibióticos que sean activos frente a las bacterias patógenas resistentes a una gran gama de antibióticos. También resulta de gran utilidad la aplicación de la ingeniería genética en microorganismos para sintetizar antibióticos sintéticos, es decir, ligeramente diferentes de aquellos obtenidos de forma natural.

DSM produce penicilina G/V por fermentación utilizando cepas de *Penicillium chrysogenum*, que han sido mejoradas por métodos clásicos de mejora de cepas así como por Ingeniería genética (40-42). Recordemos que hasta el año 1985 aproximadamente las penicilinas semisintéticas se producían vía química, a excepción del material de partida, penicilina G, que se producía por fermentación de *Penicillium chrysogenum* (Figura 17).

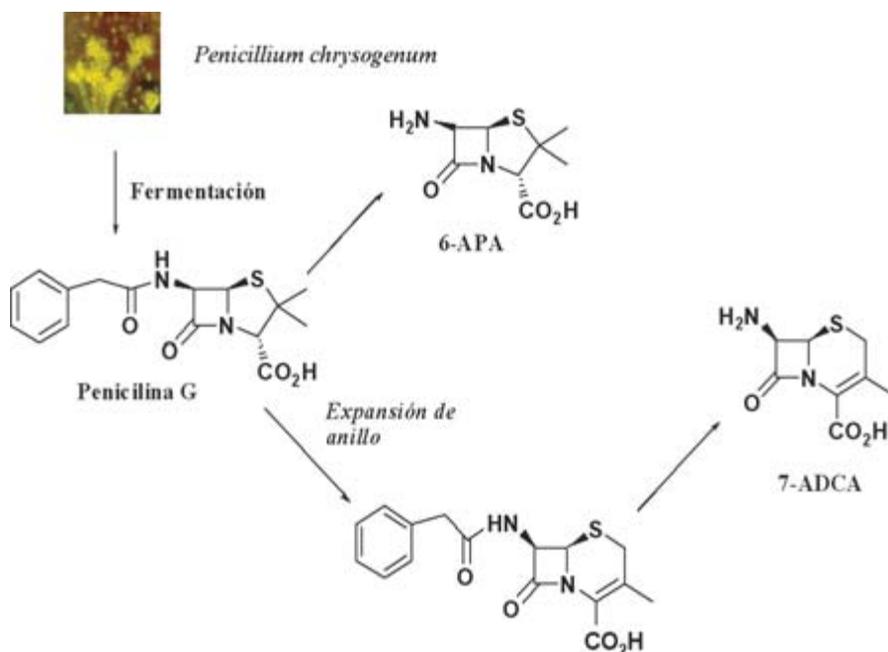


FIGURA 17. Obtención de 6-APA y 7-ADCA a partir de *Penicillium chrysogenum*.

La mayoría de las penicilinas como por ejemplo la penicilina G es transformada en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), el cual se utiliza para síntesis de penicilinas semisintéticas, obteniendo un rango de variantes de penicilinas con distintas características antibióticas (43). El ciclo del 6-APA puede expandirse por métodos químicos o por la acción de una enzima (expandasa) a una estructura adecuada para la síntesis de cefalosporinas, como el ácido 7-amino desacetoxicefalosporánico (7-ADCA). La unión de cadenas laterales a la estructura base genera derivados de penicilina y cefalosporina que han sido tradicionalmente producidos usando una química basada en disolventes complejos a temperaturas del orden de -80°C para preservar el lábil anillo de β -lactama.

Las penicilinasas (también denominadas penicilinesterasas o penicilnamidasas) son una familia de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se utilizan desde hace tiempo en la industria de los antibióticos β -lactámicos para obtener 6-APA por hidrólisis de las penicilinas G o V. También se emplean para obtener 7-ADCA por hidrólisis del producto que resulta después de expandir químicamente el anillo de la penicilina. Una combinación de D-aminoácido oxidasa y glutaril-acilasa se emplea para producir 7-ACA a partir de la cefalosporina C (44). Recientemente, estas acilasas se han utilizado para sintetizar antibióticos, ya que en determinadas condiciones también las enzimas pueden catalizar la reacción inversa con buenos rendimientos. De esta forma se consiguen las penicilinas «verdes» o ecológicas, denominadas así porque en su producción ya no se emplean los procesos químicos más contaminantes ni se generan tanta cantidad de residuos (45).

Como puede apreciarse en la Figura 18 la obtención de 1 Kg de 6-APA requiere de aproximadamente 20 Kg de reactivos por métodos químicos convencionales, frente a 0,02 Kg de NH_3 y 2 L de agua por métodos biotecnológicos.

Desde hace tiempo, los genes de estas enzimas se han clonado y manipulado no sólo para mejorar su producción sino para obtener enzimas más eficaces tanto para la hidrólisis como para la síntesis.

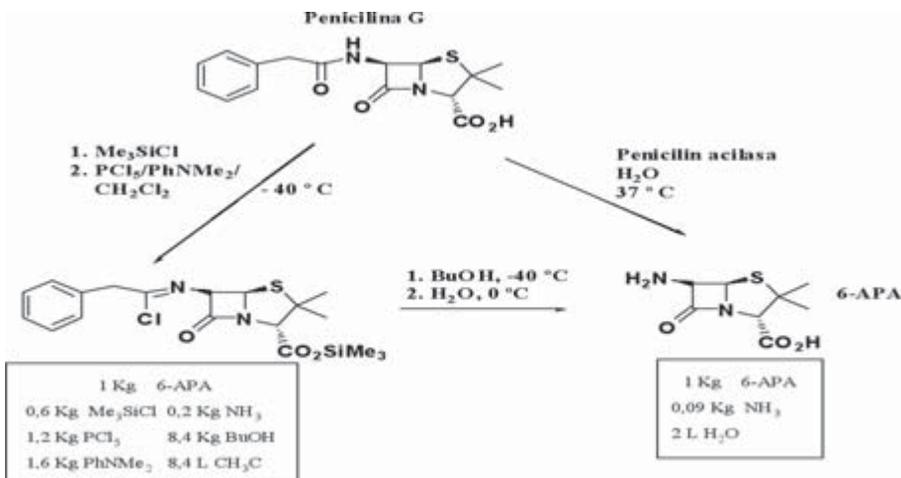


FIGURA 18. *Obtención de 6-APA por métodos químicos y métodos biotecnológicos.*

La D-fenilglicina y D-p-hidroxifenilglicina, que son las cadenas laterales que se unen al esqueleto de 6-APA o 7-ADCA en los antibióticos semisintéticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina y cefadroxilo son también producidas por DSM (46, 47) (Figura 19).

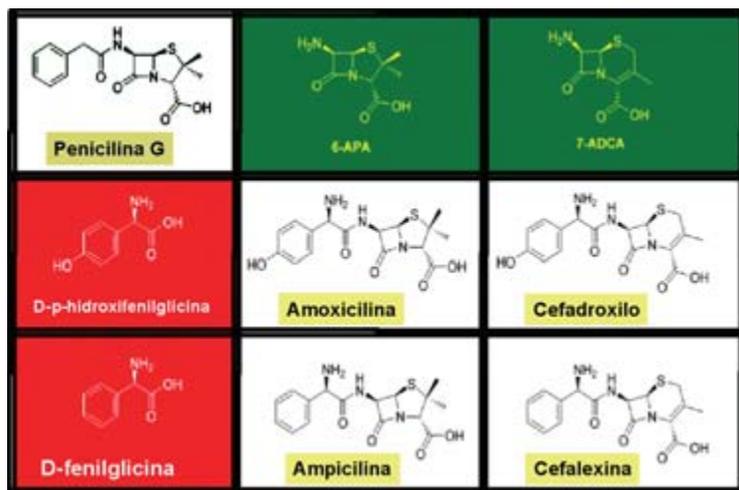


FIGURA 19. *Unión de la cadena lateral biocatalíticamente a partir de penicilacilasas.*

La unión de la cadena lateral al núcleo ha sido desarrollada desde hace tiempo por vía química pero DSM ha completado recientemente el desarrollo de un proceso biocatalítico usando otra penicilacilasa. Bajo ciertas condiciones de pH y controlando, las concentraciones de precursor y producto la unión de las dos moléculas puede competir con la reacción inversa de hidrólisis catalizada por la misma enzima y con buenos rendimientos.

5. BIOTECNOLOGÍA BLANCA Y QUÍMICA SOSTENIBLE

Una de las mayores aportaciones que se espera de la Biotecnología Industrial es que ayude a reducir el impacto de la industria en el medio ambiente, consiguiendo que los procesos industriales sean mucho más eco-eficientes. Una de las prioridades sería la reducción de las emisiones de CO₂ debido a la preocupación actual por el denominado cambio climático, entre cuyas principales causas se encuentra la emisión a la atmósfera de los gases de efecto invernadero.

Otro objetivo prioritario sería la reducción, gestión y reciclaje de residuos. Los procesos biotecnológicos, por su elevada eficiencia y especificidad, cuentan entre sus propiedades más características el que generan unos menores niveles de residuos que los procesos químicos convencionales y, además, esos residuos son comparativamente mucho menos peligrosos. Además, una parte más o menos importante de los residuos generados en los bioprocesos, son susceptibles a su vez de ser reutilizados como materia prima de partida para otros bioprocesos, lo que tiene un doble beneficio. Por un lado, contribuye a solucionar el problema medioambiental que supone la generación de residuos y, por otro lado, valoriza dichos residuos al utilizar una materia prima extremadamente barata para obtener productos de elevado valor añadido.

La Química verde o Green Chemistry tiene como objeto promover tecnologías químicas innovadoras que reduzcan el uso o generación de sustancias químicas peligrosas en el diseño, fabricación y uso de los productos químicos. De esta forma su objetivo final es reducir los problemas medioambientales no con soluciones de final de tubería, es decir no eliminando la contaminación una vez produ-

cida, sino atacando el problema de raíz es decir, utilizando procesos químicos que no produzcan residuos.

La biotecnología industrial puede proporcionar un crecimiento económico sin precedentes basado en la innovación y una tecnología benigna medioambientalmente hablando. Por estas razones, tiene que haber una transición de una sociedad basada en el uso de recursos fósiles a una de mayor sostenibilidad, donde los recursos renovables contribuyan a las necesidades materiales y energéticas. La biotecnología industrial es una tecnología clave que puede hacer esto posible. El desarrollo y uso de la biotecnología industrial es esencial para la competitividad futura de la industria europea y proporciona una base tecnológica para la sociedad sostenible del futuro.

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de mi padre.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Science, Technology and Patents, Biotechnology Statistics in OECD Member Countries: On-line Inventory accesible en www.oecd.org.
- (2) AROZENA, I. (2006): Los colores de la Biotecnología. *Biotech.* 1: 52-54.
- (3) DASILVA, E. J. (2004): The colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 1-2.
- (4) NAGANO, N. (2005): EzCatDB: the Enzyme Catalytic-mechanism Database. *Nucleic Acids Research.* 33: 407-412.
- (5) STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S. and SCHMID, A. (2002): The production of fine Chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.
- (6) NGUYEN, H. D. and SCHUMANN, W. (2006): Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells. *J. Biotechnol.* 122: 473-482.
- (7) RAMACHANDRA RAOA, S. and RAVISHANKAR, G. A. (2002): Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechn. Advances.* 20: 101-153.
- (8) URBAN, P. L.; GOODALL, D. M.; BERGSTROM, E. T. and BRUCE N. C. (2006): On-line low-volume transesterification-based assay for immobilized lipases. *J. Biotechnol.* 126: 508-518.
- (9) KIM, J.; GRATE, J. W. and WANG, P. (2006): Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Engin. Sci.* 61: 1017-1026.

- (10) HERNÁIZ, M. J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1999): Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enz. Microb. Technol.* 24: 181-190.
- (11) KIM, Y. W.; CHOI, J. H.; KIM, J. W.; PARK, C.; KIM, J. W.; CHA, H.; LEE, S. B.; OH, B. H.; MOON, T. W. and PARK, K. H. (2003): Directed Evolution of *Thermus* Maltogenic Amylase toward Enhanced Thermal Resistance. *App. Env. Microbiol.* 69: 4866-4874.
- (12) DE LA CASA, R. M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1996): Water Adsorption Isotherm as a Tool to Predict the Preequilibrium Water Amount in Preparative Esterification. *Biothechnol. Lett.* 18: 13-18.
- (13) ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1996): A New Method to Determine the Aw Range in which Immobilized Lipases Display Optimum Activity in Organic Media. *Biothechnol. Tech.* 31: 1133-1139.
- (14) ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. (1999): Thermal Stabilization of Immobilized Lipase B from *Candida antarctica* on Different Supports: Effect of Water Activity on Enzymatic Activity in Organic Media. *Enz. Microbiol. Technol.* 24: 3-12.
- (15) CHAMORRO, S.; ALCÁNTARA, A. R.; DE LA CASA, R. M.; SINISTERRA, J. V. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2001): Small water Amounts Increase the Catalytic Behaviour of Polar Organic Solvents Pretreated *Candida rugosa* Lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 11: 939-947.
- (16) Biotecnología en la Medicina del Futuro. Fundación Cotec para la innovación tecnológica. 2006.
- (17) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; NANDURI, V. B.; GOLDBERG, S. L.; JOHNSTON, R. M.; HANSON, R. L.; MCNAMEE, C. G.; BRZOWSKI, D. B.; TULLY, T. P.; KO, R. Y.; LA PORTE, T.; CAZZULINO, D.; SWAMINATHAN, S.; PARKER, L. and VENIT, J. (2000): Biocatalytic preparation of a chiral synthon for a vasopeptidase inhibitor: enzymatic conversión of N2.[N-phenylmethoxy)carbonyl]L-homocysteinyl]-L-lysine (1→1')-disulfide to [4s-(41,71,10aJ] 1-octahydro-5-oxo-4[phenylmethoxy)carbonyl amino]-7H-pyrido-[2,1-b][1,3]thiazepine-7-carboxylic acid methyl ester by a novel L-lysine ϵ -aminotransferase. *Enz. Microb. Technol.* 27: 376-389.
- (18) HANSON, R.; SCHWIDEN, M. D.; BANERJEE, A.; BRZOWSKI, D.; CHEN, B.-C.; PATEL, B. P.; MCNAMEE, C.; KODERSHA, G.; KRONENTHAL, D.; PATEL, R. N., and SZARKA, (1999): Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. *J. Bioorg. Med. Chem.* 7: 2247-2252.
- (19) HANSON, R.; HOWELL, J.; LAPORTE, T.; DONOVAN, M.; CAZZULINO, D.; ZANNELLA, V.; MONTANA, M.; NADURI, V.; SCHWARZ, S.; EIRING, R.; DURAND, S.; WASYLYK, J.; PARKER, L.; LIU, M.; OKUNIEWICZ, F.; CHEN, B.-C.; HARRIS, J.; NATALIE, K.; RAMIG, K.; SWAMINATHAN, S.; ROSSO, V.; PACK, S.; LOTZ, B.; BERNOT, P.; RUSOWICZ, A.; LUST, D.; TSE, K.; VENIT, J.; SZARKA, L. and PATEL, R. N. (2000): Synthesis of allysineethylene acetal using phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 348-358.
- (20) DAS, J.; HASLANGER, M. J.; GOUGOUTAS, J. S. and MALLEY, M. F. (1987): Synthesis 1100-1112.

- (21) HAMANAKA, N.; SEKO, T.; MIYAZAKI, T. and KAWASAKI, A. (1991): Rational Design of Thromboxane A₂ Antagonists. *Adv. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res.* 21: 359-362.
- (22) LUNA, H.; PRASAD, K. and REPIC, O. *Tet.: Asymmetry* 1994, 5, 303-306.
- (23) PATEL, R. N.; LUI, M.; BANERJEE, A.; THOTTATHIL, J. K.; KLOSS, J. and SZARKA, L. (1992): *J. Enzyme Microb. Technol.* 14: 778-784.
- (24) PATEL, R. N.; LUI, M.; BANERJEE, A. and SZARKA, L. J. (1992): Stereoselective Enzymatic-Hydrolysis of (Exo,Exo)-7-Oxabicyclo[2.2.1]Heptane-2,3-Dimethanol Diacetate Ester in a Biphasic System L. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 180-183.
- (25) PATEL, R. N.; ROBISON, R. S.; SZARKA, L. J.; KLOSS, J.; THOTTATHIL, J. K. and MUELLER, R. H. (1991): Stereospecific Microbial Reduction of 4, 5-Dihydro-4-(4-Methoxyphenyl)-6-(Trifluoromethyl-1h-1)-Benzazepin-2-One. *Enz. Microb. Technol.* 13: 906-912.
- (26) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; MCNAMEE, C. G. and SZARKA, L. (1993): Stereoselective Microbial Reduction of N-(4-(1-Oxo-2-Chloroacetyl Ethyl) Phenyl Methane Sulfonamide. *J. Appl Microbiol. Biotechnol.* 40: 241-245.
- (27) KULMATYCKI, K. M.; ABOUCHEHADE, K.; SATTARI, S. and JAMALI, F. (2001): Drug-disease interactions: reduced β -adrenergic and potassium channel antagonist activities of sotalolol in the presence of acute and chronic inflammatory conditions in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 133: 286-294.
- (28) PATEL, R. N.; MCNAMEE, C. G.; BANERJEE, A.; HOWELL, J. M.; ROBISON, R. S. and SZARKA, L. J. (1992): Stereoselective Reduction of Beta-Keto-Esters by *Geotrichum-Candidum*. *Enz. Microb. Technol.* 14: 731-738.
- (29) MAHMOUDIAN, M; EADDY, J. and DAWSON M. (1999): Enzymic acylation of 506U78 (2-amino-9- β -D-arabinofuranosyl-6- methoxy-9H-purine), a powerful new anti-leukaemic agent. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 229-233.
- (30) FEDERSPIEL, M.; FISCHER, R.; HENNIG, M.; MAIR, H. J.; OBERHAUSER, T.; RIMMLER, G.; ALBIEZ, T.; BRUHIN, J.; ESTERMANN, H.; GANDERT, C.; GOCKEL, V.; GOTZO, S.; HOFFMANN, U.; HUBER, G.; JANATSCH, G.; LAUPER, S.; ROCKEL-STABLER, O.; TRUSSARDI, R. Z. and WAHLEN, A. G. (1999): Industrial synthesis of the key precursor in the synthesis of the anti-influenza drug oseltamivir phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Org. Proc. Res. Dev.* 3: 266-274.
- (31) DRATHS, K. M.; KNOP, D. R. and FROST, J. W. (1999): Shikimic acid and quinic acid: Replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1603-1604.
- (32) KIENER, A. (1992) Int. Enzymatic Oxidation of Methyl-Groups on Aromatic Heterocycles - a Versatile Method for the Preparation of Heteroaromatic Carboxylic-Acids. *C Angew. Chem Ed. Engl.* 31: 774-775.
- (33) PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; KO, R. Y.; HOWELL, J. M.; LI, W-S. and COMEZOGU, F. T. (1994): Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidionona: a taxol side chain synthon. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20: 23-33.
- (34) PATEL, R. N.; SZARKA, L. J. and PARTYKA, R. A. (1993): Enzymatic process for resolution of enantiomeric mixtures of compounds useful as intermediates in the preparation of taxanes, E. R. Aquibn Sons Inc., EP552041.

- (35) KHMELNITSKI, Y. L.; BUDDE, CH. J.; ARNOLD, M.; USYATINSKY, A.; CLARK, D. S. and DORDICK, J. S. (1997): Synthesis of water soluble Paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 11554-11555.
- (36) EICHHORN, E.; RODUIT, J. P.; SHAW, N.; HEINZMANN, K. and KIENER, A. (1997): Preparation of (S)-piperazine-2-carboxylic acid, (R)-piperazine-2-carboxylic acid, and (S)-piperidine-2-carboxylic acid by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells. *Tet. Asymmetry*. 8: 2533-2536.
- (37) KULLA, H. (1991): Enzymatic hydroxylations in industrial application. *Chimica*, 45: 81-85.
- (38) COREY, E. J.; GIN, D. Y. and KANIA, R. S. (1996): Enantioselective Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *JACS*, 118: 9202.
- (39) CUEVAS, C.; PÉREZ, M.; MARTÍN, M. J.; CHICHARRO, J. L.; FERNÁNDEZ-RIVAS, C.; FRANCESCCH, A.; GALLEGO, P.; ZARZUELO, M.; DE LA CALLE, F.; GARCÍA, J.; POLANCO, C.; RODRÍGUEZ, I. and MANZANARES, I. (2000): Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B. *Org. Lett.* 10: 2545-2548.
- (40) BRUGGINK, A. and ROY, P. D. (2001): Industrial synthesis of semisynthetic antibiotics. In: Bruggink, A. (ed.), *Synthesis of β -Lactam Antibiotics: Chemistry, biocatalysis, and process integration*, Dordrecht: Kluwer, 12-55.
- (41) WEGMAN, M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A. (2001): Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* 343: 559-576.
- (42) TRAMPER, J.; BEEFTINK, H. H.; JANSSEN, A. E. M.; OOIJKAAS, L. P.; VAN ROON, J. L.; STUBEL, M. and SCHROËN, C. G. P. H. (2001): Biocatalytic production of semi-synthetic cephalosporins: process technology and integration. In: Bruggink, A. (ed.), *Synthesis of β -Lactam Antibiotics*, Dordrecht: Kluwer. 206-249.
- (43) ARROYO, M.; DE LA MATA, I.; ACEBAL, C. M. and CASTILLÓN, M. P. (2003): Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 507-514.
- (44) BARBER, M. S.; GIESECKE, U.; REICHERT, A. and MINAS, W. (2004): Industrial Enzymatic Production of Cephalosporin-Based β -Lactams. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 88: 179-215.
- (45) WEGMAN M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F. and SHELDON, R. A. (2001) Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* 343: 559-576.
- (46) BRUGGINK, A.; ROOS, E. C. and DE VROOM, E. (1998): Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Org. Process. Res. Dev.* 2: 128-133.
- (47) DSM Anti-Infectives. DSMPureActives™ A new standard in antibiotics. DSM Press Release, Delft, 7 December 2004.

Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact

Recibido el 15 de marzo de 2007

HERBERT ZIMMERMANN*, SANTOSH K. MISHRA,
VARSHA SHUKLA, DAVID LANGER, KRISTINE GAMPE,
IVETTE GRIMM, JASMIN DELIC, NORBERT BRAUN
*Institute for Cell Biology and Neuroscience. Biocenter, J. W.
Goethe-University. Frankfurt am Main, Germany.*

ABSTRACT

Ecto-nucleotidases hydrolyze extracellular nucleotides. Nucleotides are amongst the most ubiquitous messenger substances in the vertebrate body. Receptors for nucleotides are expressed on the surface of essentially every cell and many cells carry several types of nucleotide receptors. Several families of ecto-nucleotidases have been identified that differ in tissue distribution and functional properties. They modulate ligand availability at nucleotide and adenosine receptors. Ecto-nucleotidases were first identified in the 1940ies. Work of the past two decades has unraveled molecular identities and important functional properties. Using targeted gene deletion clear examples highlighting the importance of ecto-nucleotidases in

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

* **Contact Information:**

Dr. Herbert Zimmermann.

Institute for Cell Biology and Neuroscience. Biocenter, J.W. Goethe-University. Max-von-Laue-Str. 9. D-60438 Frankfurt am Main, Germany. Tel: 069 798 29602. FAX: 069 798 29606.

E-mail: h.zimmermann@bio.uni-frankfurt.de

Abbreviations: Ap_nA, dinucleoside polyphosphate; ART, ADP-ribosyltransferase; NADase, NAD glycohydrolases; E-NTPDase, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; E-NPP, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; IAP, intestinal alkaline phosphatase; PC-1, plasma cell differentiation antigen-1; SVZ, subventricular zone; TNAP, tissue nonspecific form of alkaline phosphatase.

nucleotide and adenosine signaling have been elaborated. These reach from the control of blood flow and angiogenesis to the modulation of immune functions and neural development. Specific ecto-nucleotidases are associated with stem cells in the adult mammalian brain, implicating a role of nucleotides and nucleosides in the control of adult neurogenesis. Ecto-nucleotidases represent important therapeutic targets to interfere with P2 or P1 receptor-mediated receptor signaling pathways. The development of high throughput assays promises a considerable acceleration in the development of subtype-specific ecto-nucleotidase inhibitors.

Key words: Alkaline phosphatase.—ATP.—Ecto-ATPase.—Neurogenesis.—5'-nucleotidase.

RESUMEN

Ecto-nucleotidasas, propiedades moleculares e impacto funcional

Las ecto-nucleotidasas hidrolizan los nucleótidos extracelulares. Los nucleótidos se encuentran entre las sustancias mensajeras más ubicuas en vertebrados. Los receptores de nucleótidos se expresan en la superficie de prácticamente todas las células y muchas células expresan varios tipos de estos receptores. Se han identificado varias familias de ecto-nucleotidasas, las cuales difieren en su distribución tisular y en sus propiedades funcionales. Modulan la disponibilidad del ligando en los receptores de nucleótidos y de adenosina. Las ecto-nucleotidasas fueron identificadas por primera vez en la década de 1940. Los trabajos de las dos últimas décadas han mostrado sus características moleculares así como importantes propiedades funcionales. Utilizando delecciones génicas dirigidas se han mostrado claros ejemplos destacables de la importancia de las ecto-nucleotidasas en la señalización por nucleótidos y adenosina. Estos ejemplos abarcan desde el control del flujo sanguíneo y la angiogénesis a la modulación de las funciones inmunes y el desarrollo nervioso. Ecto-nucleotidasas específicas están asociadas con células madre en el cerebro adulto de mamífero, implicando un papel de los nucleótidos y nucleósidos en el control de la neurogénesis adulta. Las ecto-nucleotidasas representan importantes dianas terapéuticas para interferir en las vías de señalización mediadas por receptores P2 o P1. El desarrollo de ensayos de alto rendimiento promete una considerable aceleración en el desarrollo de inhibidores de subtipos específicos de ecto-nucleotidasas.

Palabras clave: Fosfatasa alcalina.—ATP.—Ecto-ATPasa.—Neurogénesis.—5'-nucleotidasa.

INTRODUCTION

Nucleotides are amongst the most ubiquitous messenger substances in the vertebrate body. Receptors for nucleotides are expressed on the surface of essentially every cell and many cells carry several types of nucleotide receptors (1). The concept of purinergic signaling as we understand it today reaches back into the 1960ies with a number of basic discoveries made by Geoffrey Burnstock in Melbourne (2). ATP was the first nucleotide whose signaling function was discovered, but it was later shown that also other nucleotides evoke cellular responses. These include ADP, UTP, UDP, nucleotide sugars and NAD^+ as well as a variety of dinucleoside polyphosphates (3, 4). The concept of nucleotide receptors was initially developed on pharmacological and physiological grounds and subsequently corroborated by the molecular cloning and heterologous expression of nucleotide receptors. Nucleotide receptors (P2 receptors) function either as cation channels (P2X receptors) or are G-protein-coupled (P2Y receptors) (1). ATP can be released from cells via constitutive or regulated pathways (5). Extracellular nucleotides are inactivated by hydrolysis via ecto-nucleotidases with the respective nucleoside as the final hydrolysis product that can be salvaged via specific transporters (6). In the case of adenosine, additional cellular functions can be mediated by P1 receptors. Diadenosine polyphosphates act on a variety of receptors, including P1, P2X and P2Y receptors (7) and endogenous dinucleotide receptors (8).

THE BEGINNING

ATP was first identified in muscle extracts in 1929 independently by Karl Lohmann at the Kaiser Wilhelm Institute for Biology in Berlin and by Cyrus Hartwell Fiske and Yellagapada SubbaRow at Harvard University (9) (Figure 1). At that time, this discovery evoked rather little response and the role of ATP as a high energy compound and its role in carbohydrate breakdown were only realized during the years following. The same year witnessed the first publication of a biological activity of AMP and adenosine (on the heart and vasculature) (10). In 1934 J. H. Gillespie in Belfast demonstrated a

biological action of ATP on several mammalian tissues (11). Other support for a potential extracellular function of ATP came from the discovery of its storage inside secretory granules of a variety of cells such as dense granules of blood platelets (12, 13), chromaffin granules (14, 15) and later adrenergic (16) and cholinergic (17) synaptic vesicles (18). ATP was found to be costored with the neurotransmitters noradrenaline and acetylcholine. On nerve stimulation, ATP is depleted from cholinergic synaptic vesicles in parallel with acetylcholine and replenished together with acetylcholine during a subsequent period of rest. Adenosine taken up into cholinergic nerve terminals via a high affinity transporter is immediately phosphorylated and ends up again in synaptic vesicles in the form of ATP that is coreleased with acetylcholine (adenosine cycle) (19, 20).

The notion of cell surface-located ATPases reaches back into the 1940ies. To the best of knowledge, first cell surface-located hydrolysis of ATP was observed in carefully washed bull spermatozoa by T. Mann in Cambridge in 1945 (21). More detailed reports followed on the hydrolysis of ATP and ADP by intact yeast cells (22) and subsequently in human erythrocytes (23), ascites tumor cells (24) and nucleated avian erythrocytes (25, 26). First evidence for an association of ATPase activity with peripheral nerves was obtained by Abood and Gerard in 1954 (27). The pioneering methodological work of Wachstein and Meisel (1957) (28) paved the way for the enzyme cytochemical demonstration of ATP hydrolysis at the electron microscopic level that revealed the ubiquity of cell surface located ATPase activity. Essner et al. (1958) (29) were among the first to use the electron microscope to localize adenosine triphosphatase and 5'-nucleotidase activities at the plasma membrane. The term ecto-ATPase was coined in 1957 by W.A. Engelhardt from the Academy of Sciences in Moscow on the basis of his findings of surface-located ATPase activity on avian blood cells (25). He also introduced the terms ectoenzyme and ectoapyrase (26). Yet, the functional role of extracellular ATP hydrolysis remained a matter of speculation. As for the concept of nucleotide receptors, the concept of extracellular nucleotide hydrolysis was met by the scientific community with great skepticism.

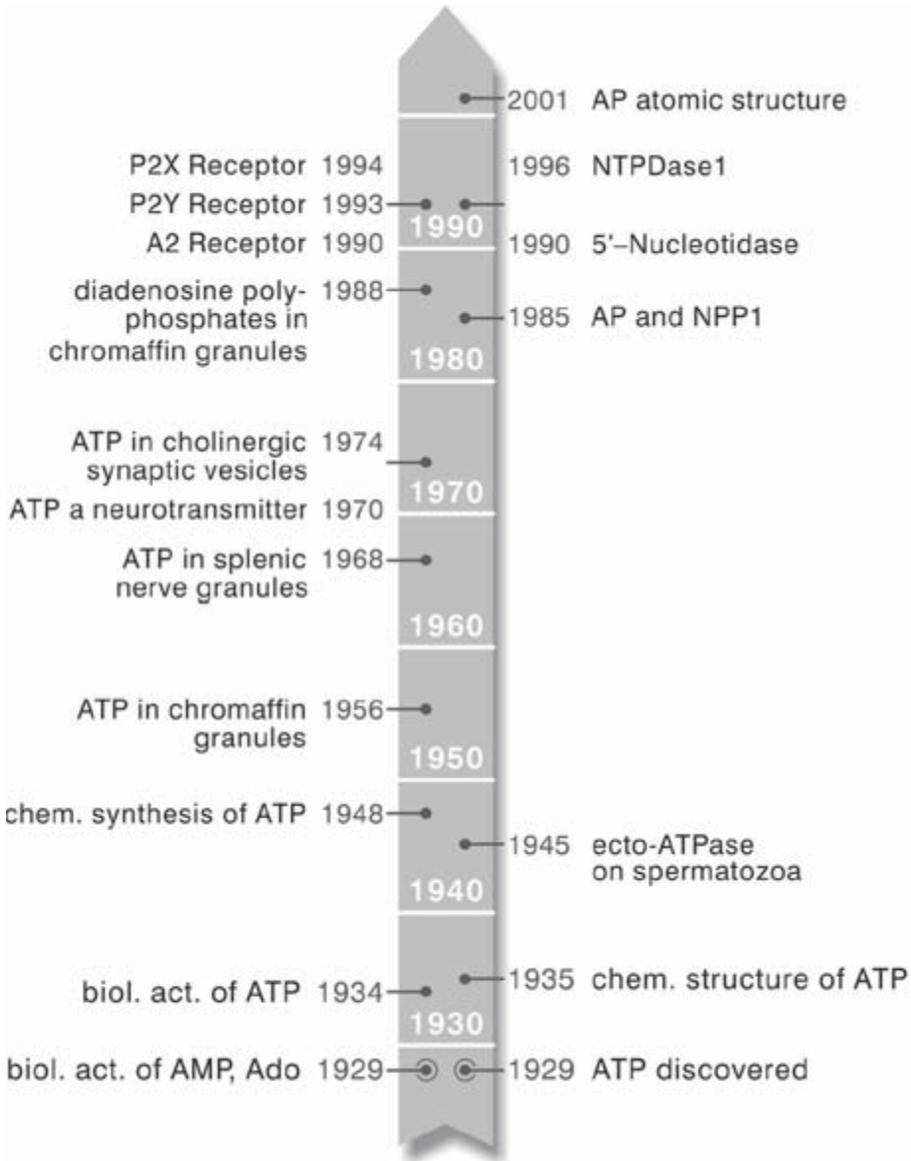


FIGURE 1. *Hallmarks of nucleotide research with particular emphasis on signaling via extracellular nucleotides.* ATP was first discovered in 1929 and in the 1980ies and 1990ies the molecular and functional identity of prototype members of all ecto-nucleotidase families and of nucleoside and nucleotide receptor families was uncovered (for references see text). Ado, adenosine; A2 receptor, adenosine A2 receptor; AP, alkaline phosphatase (human placental).

This skepticism was eventually overcome by the molecular cloning, heterologous expression, analysis of membrane topology and functional characterization of the molecular players involved. The first ones were the nucleotide-hydrolyzing enzymes placental alkaline phosphatase (30), ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (31) and ecto-5'-nucleotidase (32), followed by the first adenosine (A2) receptor (33), the first P2Y receptors (34, 35) and P2X receptors (36, 37) and finally the molecular identification of the first mammalian member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family NTPDase1 (CD39) (38, 39).

MULTIPLICITY OF ECTO-NUCLEOTIDASES

We now know that extracellular nucleoside triphosphates and -diphosphates can be hydrolyzed by a variety of ecto-nucleotidases belonging to three different enzyme families with several members each (Figure 2, Table 1). These include the E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) (40, 41), the E-NPPs (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases) (42-44) and the alkaline phosphatases (45, 46). As for the adenosine and nucleotide receptors (47), the identification and molecular cloning of an increasing number of these enzymes required an adjustment of nomenclature. Scientists at the Second International Workshop on Ecto-ATPases proposed that all E-NTPDase family members be termed as NTPDase proteins and all members of the E-NPP-family as NPPs, classified in order of discovery and characterization (40, 48). These enzymes vary considerably regarding substrate preference and affinity, product formation, cation dependence and pH optimum. Recently, an ecto-form of the mitochondrial F_1F_0 ATP synthase/ F_1 ATPase has been implicated in extracellular ATP synthesis or also hydrolysis. The subunit arrangement of the ecto-form and its functional properties require further characterization (49).

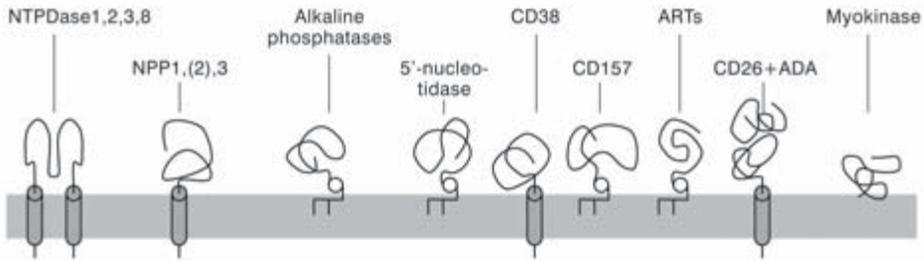


FIGURE 2. **Membrane topology of ecto-nucleotidases and other nucleotide-metabolizing enzymes.** In contrast to NPP1 and NPP3 that are type 2 membrane proteins, NPP2 is a secreted protein. Soluble adenosine deaminase (ADA) is bound to the cell surface via the GPI-anchored protein CD26 (dipeptidyl peptidase IV). CD38 and CD157 are NAD glycohydrolases (NADases). ARTs are ADP-ribosyltransferases that (in part) also metabolize NAD⁺. Substrates and products are given in Table 1. Not shown: Nucleoside diphosphate kinase and F₁F_o ATPsynthase/F₁ ATPase. Extracellular ATP can also serve as a co-substrate for ecto-protein kinases.

Extracellular NAD⁺ can be cleaved by E-NPPs but also by two closely related families of extracellular NAD⁺ metabolizing enzymes, NAD glycohydrolases (NADases) (CD38, CD157) and mono(ADP-ribosyl)transferases (ARTs) (50) (Table 1). Ecto-5'-nucleotidase, of which only a single gene exists in the mammalian genome, hydrolyses only nucleoside monophosphates (51, 52). Additional surface-located enzymes catalyze nucleotide interconversion and thus the extracellular synthesis of nucleoside triphosphates and diphosphates. These include ecto-nucleoside diphosphokinase and the adenine nucleotide-specific ecto-ATP:AMP phosphotransferase (adenylate kinase, myokinase) (53, 54) (Figure 2). Obviously, ecto-nucleotidases are even more diverse than nucleotide receptors and we are only beginning to understand their specific function in the context of the modulation of ligand availability at nucleotide and nucleoside receptors. Some of the principal properties of ecto-nucleotidases are briefly summarized below.

TABLE 1. *Ecto-nucleotidases and other enzymes metabolizing extracellular nucleotides*

<i>Family</i>	<i>Surface-located forms</i>	<i>Substrates</i>	<i>Final product</i>	<i>Inhibitors</i>
Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases	NTPDase1, NTPDase2, NTPdase3, NTPDase8	NTP, NDP	NMP	ARL 67156, 8-BuS-ATP, polyoxometalates, P2 receptor antagonists
Ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterases	NPP1, NPP3, NPP2, secreted	NTP (NDP) dinucleoside polyphosphates NAD ⁺ UDP-glucose	NMP + PPi, (Pi) NMP + Np _{n-1} AMP + nicotinamide mononucleotide UMP + Glucose-6-phosphate	P2 receptor antagonists, heparin, heparan sulphates
Alkaline phosphatases	Kidney/bone/liver [= tissue non-specific form, TNAP], Placental, Intestinal, Germ-cell	NTP, NDP, NMP	Nucleoside	Levamisole, L-homoraginine L-phenylalanine
Ecto-5'-nucleotidase	Ecto-5'-nucleotidase	NMP	Nucleoside	AOPCP
Adenylate kinase	AK1-6, not identified	ADP or AMP + ATP	AMP + ATP or ADP	Ap ₅ A
NAD⁺ glycohydrolases (NADases)	CD38, CD157	NAD ⁺	ADP-ribose and nicotinamide, (cyclic ADP-ribose)	NAD ⁺ analogues
Mono(ADP-ribosyl) transferases	ART1-ART5 ART2	NAD ⁺ NAD ⁺	ADP-ribosylated protein ADP-ribose and nicotinamide	
Nucleoside diphosphate kinase	nm23-M1-6, not identified	N ₁ TP, N ₂ DP	N ₁ DP, N ₂ TP	
ATP-synthases	Ecto-F ₁ F _o ATPsynthase/ F ₁ ATPase	ADP	ATP	Oligomycin

Ap₅A, *P¹P⁵-di (adenosine-5') pentaphosphate*; ARL 67156, *6-N,N-diethyl-D-β,γ-dibromomethylene ATP*; *BuS-ATP*, *8-thiobutyladenosine 5'-triphosphate*; AOPCP, *α,β-methylene adenosine 5'-diphosphate*; both ATP synthesis and ATP-hydrolysis has been reported for *ecto-F₁F_o ATPase*. The subtype of surface-located adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase has not been identified.

E-NTPDases

This enzyme family comprises eight different members of which only NTPDase1-3 and 8 are typical cell surface-located enzymes, with two transmembrane helices and a large extracellular domain carrying the catalytic site (40, 41, 55) (Figure 2). Of the intracellular enzymes (NTPDase4-7) that hydrolyze nucleoside diphosphates and/or triphosphates but not ATP, NTPDase6 and NTPDas6 can be released in soluble form. All enzymes are members of the actin/HSP70/sugar kinase superfamily with whom they share common sequence motifs as well as a conserved secondary structure (56, 57). Structural predictions have been derived from mutagenic analyses and computational modeling based on homology with a bacterial exopolyphosphatase (58). The ectoenzymes form homooligomeric complexes. All members of the NTPase gene family are also expressed in *Xenopus* (59).

The surface-located NTPDases1-3 and 8 reveal a partially overlapping tissue distribution but apparently are expressed by different cells (55, 60). NTPDase1 corresponds to the lymphoid cell activation antigen CD39. It is expressed by cells of the immune system, the quiescent vascular endothelium and a variety of other cells including the microglia of the brain (41, 61, 62). NTPDase2 is associated amongst others with the adventitial surfaces of the muscularized vessels, microvascular pericytes, portal fibroblasts from the liver, within taste papillae, the inner ear, with immature and nonmyelinating Schwann cells of the peripheral nervous system (63) and neural progenitor cells of the adult rodent brain (41, 64, 65). NTPDase3 is expressed in brain and in a variety of other tissues (56, 66, 67) whereas expression of NTPDase8 in the brain is very low or absent (55).

Importantly, the hydrolysis rates for nucleoside diphosphates vary considerably between the four enzymes (60, 68). NTPDase2 stands out for its high preference for nucleotide triphosphates and thus is also referred to as an ecto-ATPase. In addition the enzymes differ regarding product formation. Whereas NTPDase1 hydrolyzes ATP directly to AMP with the production of minor amounts of free ADP, ADP accumulates extracellularly on ATP hydrolysis by NTPDase2. NTPDase3 and NTPDase8 reveal intermediate patterns of product

formation. These differences in catalytic properties differentially affect the scavenging or the production of agonists for P2 receptors by individual enzymes or combinations of these.

E-NPPs

The three nucleotide-hydrolyzing members of the E-NPP family, NPP1 to NPP3, hydrolyze 5'-monodiester bonds in nucleotides and their derivatives, resulting in the release of 5'-nucleoside monophosphates. E-NPPs are members of the alkaline phosphatase superfamily and their catalytic core structure reveals close similarity to the superfamily of phospho-/sulfo-coordinating metalloenzymes comprising alkaline phosphatases, phosphoglycerate mutases, and arylsulfatases (69, 70). All three enzymes share a typical modular structure. NPP1 and NPP3 are type II transmembrane glycoproteins that also occur in soluble form whereas NPP2 is secreted. The enzymes have a broad tissue distribution (42, 43). NPP1 was originally discovered at the surface of lymphocytes as plasma cell differentiation antigen (PC-1). Physiological substrates of these enzymes include ATP, NAD⁺, nucleotide sugars and dinucleoside polyphosphates (42, 43, 71). ATP is an inhibitor of diadenosine polyphosphate hydrolysis (72). In several tissues investigated, diadenosine polyphosphates are hydrolyzed considerably more slowly than ATP, implicating a prolonged extracellular half-life of these nucleotides (73). Nucleotide hydrolysis by NPPs has a very alkaline pH optimum (8.5 - 9.0), comparable to that of alkaline phosphatases. In addition to its nucleotidase activity, the splice variant of NPP2, autotaxin, also exerts lysophospholipase D activity (74). The four additional and non-nucleotide-hydrolyzing members of the E-NPP family NPP4 to NPP7 are shortened at the N terminus, with presumptive inverse membrane topography. Of these, NPP6 and NPP7 exhibit lysophospholipase-C or choline glycerophosphodiester phosphodiesterase activity (43).

NPP1 to NPP3 hydrolyze ligands of nucleotide receptors. In the case of nucleoside triphosphates, hydrolysis typically proceeds directly to the nucleoside monophosphate with the formation of PPi (Table 1). This circumvents activation of receptors for nucleoside

diphosphates. NPP1 is a major source of extracellular PPI which is highly relevant in the control of bone mineralization (44). Hydrolysis of dinucleoside polyphosphates (Ap_nAs) by NPPs is asymmetric and involves the α , β -pyrophosphate bond, resulting in the production of AMP and Ap_{n-1} (71). Thus, hydrolysis of Ap_5A , Ap_4A , or Ap_3A yields adenosine tetraphosphate, ATP and ADP, respectively (72). This could in turn lead to the additional or also continued activation of P2 receptors, depending on available receptor subtype. NAD^+ is hydrolyzed by NPPs to AMP and nicotinamide mononucleotide.

Alkaline phosphatases

The four human isoforms of alkaline phosphatases (kidney/bone/liver [= tissue non-specific form, TNAP], placental, intestinal and germ-cell) are dimers, share a glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor and can give rise to soluble forms. The distribution of isoforms varies to some extent between humans and rodents (45, 46). Alkaline phosphatases are non-specific phosphomonoesterases that degrade nucleoside 5'-tri-, -di-, and -monophosphates, hydrolyze inorganic pyrophosphate (PPI) and also release inorganic phosphate from a large variety of organic compounds, including proteins. Thus, alkaline phosphatases are capable of directly producing the P1 receptor agonist adenosine from extracellular ATP. Their pH optimum is in the high alkaline range but they hydrolyze ATP also at a pH of 7.4. Alkaline phosphatases certainly play an important role in purine salvage but they can also modulate purinergic signaling. The crystal structures of bacterial, shrimp and human enzymes have been resolved (45, 75).

NUCLEOTIDE SYNTHESIS AND INTERCONVERSION

Ecto-nucleoside diphosphate kinase interconverts nucleoside 5'-di- and -triphosphates, leading to the formation of e.g. UTP and ADP from ATP and UDP or of ATP and UDP from UTP and ADP. This can result in the mutual activation or inactivation of receptors for ATP, ADP, UTP and UDP. Together with other ecto-nucleotidases, ecto-nucleoside diphosphate kinase may maintain low steady state

concentrations of nucleoside triphosphates at the cell surface, leading to tonic receptor activation. Ecto-ATP:AMP phosphotransferase (adenylate kinase, myokinase) catalyzes the extracellular formation of ATP and AMP from ADP and vice versa (53, 54, 76).

ECTO-5'-NUCLEOTIDASE

The GPI-anchored ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a Zn^{2+} -binding dimeric protein that hydrolyzes nucleoside monophosphates to their respective nucleosides. It differs from intracellular 5'-nucleotidases (52). The crystal structure of the periplasmic 5'-nucleotidase from *Escherichia coli* (77) serves as a model for the structural analysis of the related mammalian enzyme (78). Like alkaline phosphatase, ecto-5'-nuceotidase can catalyze the formation of adenosine from extracellular AMP and the concomitant activation of P1 adenosine receptors. ATP and ADP inhibit AMP hydrolysis, resulting in feed forward inhibition of ecto-5'-nucleotidase (79). The enzyme is broadly distributed within various tissues and associated also with the vascular endothelium but apparently with an expression pattern different from alkaline phosphatase (TNAP) (80).

CD38 AND RELATED PROTEINS

NAD glycohydrolases (NADases) (CD38, CD157) and ADP-ribosyltransferases (ARTs) represent two closely related families of extracellular NAD^+ metabolizing enzymes that cleave NAD^+ at the adenosine diphosphoribosyl-nicotinamide linkage. NADases convert NAD^+ to ADP-ribose and nicotinamide and due to their additional ADP-ribosyl cyclase activity also to cyclic ADP-ribose. ARTs also transfer ADP ribose to acceptor proteins, including the $P2X_7$ receptor (81, 82). The extracellularly formed cyclic ADP-ribose is considered to be transported into the cell where it activates Ca^{2+} release from intracellular stores (50).

ECTO-NUCLEOTIDASES AND PURINERGIC SIGNALING

It is obvious that the broad spectrum of ecto-nucleotidase enzyme species as well as the considerable variability of their catalytic properties allows for multiple modulations of purinergic signaling—depending on type and combination of enzymes as well as receptors. Ecto-nucleotidases could for example (1) inactivate P2 receptors sensitive to nucleoside triphosphates by directly hydrolyzing a nucleoside triphosphate to the inactive nucleoside monophosphate, (2) inactivate P2 receptors sensitive to nucleoside triphosphates and at the same time (by generating the nucleoside diphosphate) transiently or tonically produce agonists for nucleoside diphosphate receptors, (3) inactivate receptors for e.g. diadenosine polyphosphates and at the same time generate the physiologically active ligands Ap₄, ATP or ADP, (4) prevent P2 receptor desensitization, (5) generate the P1 receptor agonist adenosine from extracellular ATP. Following release of ATP, this allows for complex signaling mechanisms in cellular networks that can involve both, P2 and P1 receptor activation. Therefore a detailed analysis of nucleotide signaling pathways requires information on the identity and exact location of both ecto-nucleotidase and purinergic receptor subtypes for each individual cellular setting investigated.

In vitro studies using recombinant proteins, mimicking different combinations of receptors and enzymes underline this notion. (83). The data demonstrate that ecto-nucleotidases can selectively modulate the effective agonist concentration at P2Y₁ receptors on identical or neighboring cells, either by degrading ATP or by generating ADP from ATP. In addition, colocalized ecto-nucleotidases, by reducing levels of constitutively released nucleotide, reduce receptor desensitization. Preventing receptor desensitization following tonic or acute nucleotide release may be an important function of ecto-nucleotidases.

This close interaction between enzymes and ecto-nucleotidases is also of immediate relevance *in situ*. The interaction between the two ecto-nucleotidases NTPDases1 and NTPDase2 is of pivotal importance for the control of vascular platelet activation. NTPDase1 is expressed by endothelial cells, vascular smooth muscle cells and to a small extent by red blood cells and platelets. Due to its capacity

to hydrolyze ATP to AMP and ADP to AMP it blocks platelet aggregation in response to ADP thus supporting blood flow. Accordingly, NTPDase1 knockout mice reveal increased infarct volumes. Infusion of soluble derivatives of NTPDase1 or soluble plant apyrases improves blood flow and tissue reperfusion following ischemia and in tissue transplants (41, 84). NTPDase2 produces ADP from ATP and thus promotes platelet activation. The enzyme is located at adventitial surfaces of the muscularized vessels, microvascular pericytes of some tissues and organs as the heart and the stromal cells and would potentially favor ADP-induced platelet aggregation at sites of vessel injury and thus support hemostasis (85, 86).

In another setting, portal fibroblasts were suggested to regulate bile duct epithelial proliferation via expression of NTPDase2. NTPDase2 inhibits and knockdown of NTPDase2 by RNA interference increases the proliferation of epithelial cells, apparently by compromising their nucleotide scavenging effect. Loss of portal fibroblast NTPDase2 following bile duct ligation may thus mediate the bile ductular proliferation typical of obstructive cholestasis (87).

BROAD FUNCTIONAL IMPACT OF ECTO-NUCLEOTIDASES

As shown by a considerable number of immunocytochemical or enzyme histochemical studies defined ecto-nucleotidases are expressed in specific tissues or cellular systems. In many cases a resolution at the electron microscopic level would be desirable to identify their exact localization and site of action. This particularly applies to the nervous system. Yet, the demonstration of the expression of an enzyme in a defined cellular setting does not permit an immediate anticipation of its functional impact. This depends on the actual catalytic activity and the scenario of the surrounding purinergic receptors. But the identification of ecto-nucleotidases may serve as a first indicator of a functional involvement of nucleotide signaling pathways. Presently, the best tool for studying the functional impact of a particular ecto-nucleotidase in a defined purinergic signaling pathway is the use of specific high affinity inhibitors (if available), the knockdown by RNA interference or the

targeted deletion of the respective gene. The addition of the soluble ATP- and ADP hydrolyzing enzyme apyrase can corroborate the involvement of nucleotide signaling but does not provide immediate evidence for a participation of endogenous ecto-nucleotidases.

TARGETED DELETION OF ECTO-NUCLEOTIDASES

The targeted deletion of NTPDase1 has yielded important insight into the functional role of NTPDase1 in vascular control (88) and in the immune system (89). Inactivation of mouse intestinal alkaline phosphatase (IAP) revealed a functional involvement in fat absorption (90). Knockout mice for NPP1 have been characterized in addition to a natural mutant of NPP1 (tiptoe walking mouse). Deficiency of NPP1 is associated with pathological calcification of ligaments and joint capsules (42). Mutations in the TNAP gene in humans cause hypophosphatasia involving defective mineralization of hard tissue. Mice lacking TNAP can serve as a model for the infantile form of hypophosphatasia and also reveal deficiencies in nervous system development and a number of severe tissue abnormalities (91, 92). Knockouts of the embryonic form of alkaline phosphatase or double knockouts for TNAP and the embryonic form do not reveal additional phenotypes (91). Double knockouts for TNAP and NPP1 underline the opposing and reciprocal actions of NPP1 and TNAP in the production and hydrolysis of extracellular PPi and thus in the control of bone mineralization, respectively. They suggest that both TNAP and NPP1 are potential therapeutic targets for the treatment of mineralization disorders (44, 93, 94). These effects on mineralization appear to reflect the balance of extracellular PPi and Pi levels controlled by the two enzymes rather than P2 or P1 receptor-mediated mechanisms.

NPP2 (autotaxin) knockouts die at embryonic age and investigations on heterozygous mice underline the notion that phospholipase D activity and thus the production of lysophosphatidic acid represents a major functional role of the enzyme (95). Mice in which the ecto-5'-nucleotidase gene is disrupted do not reveal an apparent phenotype when kept under normal conditions but detailed studies corroborated the physiological importance of the enzyme in

the formation of extracellular adenosine from extracellular nucleotide in several tissue functions (96). Deletion of CD38 underlined the role of the protein in regulating the humoral immune response (97) but also revealed its participation in osteoclast formation and bone resorption (98). Similarly, deletion of CD157 implicates a role in B cell development and antibody production (99).

From these and from many additional studies it has become evident that ecto-nucleotidases are involved in the control of a large variety of physiological and pathophysiological functions mediated by nucleotides (41-44, 50, 96, 100, 101). Examples include epithelial ion and fluid transport (5'-nucleotidase), tissue barrier functions such as the transmigration of leucocytes through the vascular endothelium (5'-nucleotidase; CD38), blood flow, including platelet aggregation and ischemia and reperfusion (5'-nucleotidase, NTPDase1), angiogenesis and vascular remodeling (NTPDase1), renal function (5'-nucleotidase), hypoxia (5'-nucleotidase, NTPDase1), the immune system (CD38, NPP1, NTPDase1, 5'-nucleotidase), the function of airway epithelia including chronic lung disease (NPPs, NTPDases, alkaline phosphatase, ecto-adenylate kinase, ecto-5'-nucleotidase) or bone and cartilage mineralization (NPP1, TNAP). In the nervous system, ecto-nucleotidases have been implicated in a considerable variety of functions, including synaptic signal transmission, microglial function and neurogenesis. There is increasing evidence for an involvement of ecto-nucleotidases in sensory transmission as for example for NTPDase1 to NTPDase3 in the inner ear (102).

INHIBITORS OF ECTO-NUCLEOTIDASES

Inhibition of ecto-nucleotidases represents an important mode to target nucleotide signaling pathways. Obviously, targeting ecto-nucleotidases will affect not only nucleotide signaling *per se* but also additional cooperative or opposing signaling pathways. Ideally, ecto-nucleotidase inhibitors should neither be P2 or P1 receptor agonists or antagonists nor substrates of ecto-nucleotidases (60, 103).

Inhibitors of NTPDases (Table 1) include non-hydrolyzable nucleotide analogues and P2 receptor antagonists. Among the

compounds that have been reported to inhibit hydrolysis of ATP without significantly acting on purinoceptors are the structural analogues of ATP, ARL 67156 (FPL 67156) (6-*N,N*-diethyl-D- β , γ -dibromomethylene ATP) (104-106) and 8-thiobutyladenosine 5'-triphosphate (8-BuS-ATP) (107) and 1-naphthol-3, 6-disulfonic acid (BG0136) (103). Recently, high throughput assay systems for ecto-nucleotidase analysis have been developed and polyoxometalates have been implicated as a new class of very potent NTPDase inhibitors (108, 109). These substances can be applied systemically and hold promise to finally provide a pharmacological access to this enzyme family. Importantly, the potency of these and other inhibitors can vary considerably between the individual members of the E-NTPDase family (109-111). This opens the possibility of isoform-specific ecto-nucleotidase targeting.

Similarly, the hydrolysis of A_p_n As by NPP1 to NPP3 is differentially inhibited by P2 receptor antagonists. Thus, the application of P2 receptor inhibitors will potentially obscure pharmacological experiments in which the effects of A_p_n As on P2 receptors are investigated. A_p_n A hydrolysis and P2 receptors would be simultaneously blocked. In addition, submilligram quantities of heparin or heparan sulphate inhibit activity of NPPs in a variety of cellular systems (71). Inhibition of alkaline phosphatase equally varies between isoforms. TNAP is particularly sensitive to levamisole and L-homoraginine. The other isoforms are sensitive to L-phenylalanine (112). Ecto-5'-nucleotidase is inhibited by ATP and ADP and by the non-hydrolyzable ADP analogue α,β -methylene adenosine 5'-diphosphate (AOPCP) (51). Several NAD^+ analogues have been employed as inhibitors of CD38 (113) and P^1P^5 -di (adenosine-5') pentaphosphate (A_p_5A) is a potent inhibitor of adenylate kinase, inclusive its surface-located form (76).

ECTO-NUCLEOTIDASES IN THE NERVOUS SYSTEM

Since both nucleotides and nucleosides contribute to signaling between neurons and also between glial cells and glia and neurons (114, 115) it is expected that ecto-nucleotidases play an important role in modulating and controlling these signaling pathways.

Synaptic transmission: Some of the best evidence for a modulatory role for ecto-nucleotidases in purinergic signal transmission stems from investigations of the peripheral nervous system. Stable analogues of ATP are up to a hundred times more potent than ATP in causing smooth muscle contraction. ARL 67156 potentiates contractions caused by nerve stimulation or application of ATP (116). This suggests that ecto-nucleotidases tonically attenuate ATP-mediated signal transmission, an effect relieved by the enzyme inhibitor. At hippocampal synapses, ATP is rapidly hydrolyzed to adenosine that in turn activates pre- or postsynaptic receptors, thereby modulating synaptic transmission (79, 117, 118). In accordance with these observations, the inhibitory synaptic effects of nucleotides or of adenosine are abrogated in mice lacking A₁ adenosine receptors (119).

Astrocyte signaling: ATP is a major extracellular mediator in the propagation of Ca²⁺-waves between astrocytes in various brain regions and within the retina. Ca²⁺-waves may be involved in the modulation of synaptic transmission and in neuron-glia bi-directional communication (120, 121). While inhibition of ecto-nucleotidase activity facilitates and addition of potato apyrase attenuates the physiological action of ATP in these experimental settings, sites and extent of endogenous hydrolysis and the type of endogenous ecto-nucleotidase involved need to be identified.

Microglia: Of all neuronal and glial cells, microglia stands out for its high surface-located nucleotidase activity that has been identified as NTPDase1 (61, 62). Ischemia enhances long-term microglial ecto-nucleotidase expression. ATP stimulates microglia to release various biologically active substances, induces chemotaxis of cultured microglia and can, at high doses, induce microglial death (122). In addition, spinal cord microglia is involved in inducing tactile allodynia caused by peripheral nerve injury which is gated by P2X₄ receptors (123). The functional role of the very high microglial ecto-nucleotidase activity needs to be elucidated. It may increase the threshold for ATP-mediated microglial activation and the subsequent release of signaling substances or may prevent receptor desensitization.

Cerebral vascular control: NTPDase1 knockout mice reveal increased cerebral infarct volumes and reduced postischemic perfusion following middle cerebral artery occlusion. Similarly, a

recombinant soluble and catalytically active form of NTPDase1 restores postischemic cerebral perfusion and rescues from cerebral injury (84, 124). The production of the antithrombotic metabolite adenosine by endothelial ecto-5'-nucleotidase provides an additional mechanism for down-regulating platelet aggregation. The functional importance of vascular ecto-5'-nucleotidase in the formation of extracellular adenosine from released adenine nucleotides has recently been corroborated by the analysis of ecto-5'-nucleotidase knockout mice (80, 125).

Adult neurogenesis: Ecto-nucleotidases are expressed on neural progenitors and their expression pattern varies during development of the nervous system (126). Recent work has established the presence of stem cells in the adult mammalian brain. In the adult murine brain, neurogenesis, the formation of new neurons from neural progenitor cells, continuously takes place in two actively proliferating zones, the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the dentate gyrus of the hippocampus. These cells share properties of astrocytes and give rise to highly proliferating intermediate cell types that finally mature and form neurons. Interestingly, the ecto-ATPase NTPDase2 is highly and selectively expressed by the stem cells (type B cells) of the SVZ (64) and by the progenitor cells (residual radial glia) of the dentate gyrus (65). The enzyme is no longer expressed by the progenitor cell-derived neurons. Moreover, SVZ-derived stem cells cultured as neurospheres in the presence of the growth factors EGF and FGF-2 express NTPDase2. The enzyme becomes expressed in the neurogenic regions of the rodent brain only during late gestation and thus is not involved in embryonic neurogenesis. NTPDase2 represents a very useful and reliable marker for the identification of adult neural stem cells.

Additional investigations revealed the expression of the tissue non-specific form of alkaline phosphatase (TNAP) on all cell types of the neurogenic SVZ, including stem cells, transient amplifying cells and immature neuroblasts (D. Langer, unpublished). This imposes a challenging scenario to the regulation of nucleotide signaling to the densely interacting cellular elements of the neurogenic zone and implies the functional involvement of both nucleotide and nucleoside receptors. Indeed, neurosphere cells *in vitro* respond to P2 receptor agonists and to adenosine with an increase in cell proliferation.

Inhibition of the P2 receptors attenuates cell proliferation in spite of the presence of mitogenic growth factors (127). Similarly, nucleotides stimulate proliferation and dopaminergic differentiation of human fetal midbrain neural precursor cells (128). These data provided strong evidence that ecto-nucleotidases, nucleotides and nucleosides, in concert with other signaling substances, can play a role in controlling neurogenesis from resident stem cells in the adult mammalian brain.

SYNOPSIS

Nucleotides control major physiological and pathophysiological functions in every tissue and, due to the essentially ubiquitous distribution of nucleotide and adenosine receptors, initiate a large variety of cellular responses. They act as fast transmitters and, presumably in the majority of cases, as modulators, often in combination with other signaling molecules. Crosstalk between nucleotide or nucleoside receptors with receptors for e.g. growth factors has been demonstrated. This highlights the functional significance of interactive pathways between nucleotides and other cellular messengers. A major role of ecto-nucleotidases in these settings is in the modulation of ligand availability for nucleotide and nucleoside receptors. The understanding of the abundance of ecto-nucleotidases and of their varying catalytic properties remains a challenge but excellent examples for a cell or tissue-specific association and function of individual enzymes have been elaborated. Ecto-nucleotidases represent important therapeutic targets for interfering with P2 or P1 receptor-mediated cellular signaling pathways. The recent development of high throughput assays for the development of ecto-nucleotidase inhibitors is expected to considerably accelerate this long neglected aspect of nucleotide research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (140/17-1).

REFERENCES

- (1) BURNSTOCK, G. and KNIGHT, G. E. (2004): Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240: 31-304.
- (2) BURNSTOCK, G. (1972): Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509-581.
- (3) BURNSTOCK, G. (1998): History of extracellular nucleotides and their receptors. in: *The P2 Nucleotide Receptors* (Turner J. T., Weisman G. A. and Fedan J. S., Eds), pp. 3-40. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- (4) MORESCHI, I.; BRUZZONE, S.; NICHOLAS, R. A.; FRUSCIONE, F.; STURLA, L.; BENVENUTO, F.; USAI, C.; MEIS, S.; KASSACK, M. U.; ZOCCHI, E. and DEFLORA, A. (2006): Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 281: 31419-31429.
- (5) SCHWIEBERT, E. M.; ZSEMBERY, A. and GEIBEL, J. P. (2003): Cellular mechanisms and physiology of nucleotide and nucleoside release from cells: Current knowledge, novel assays to detect purinergic agonists, and future directions. in: *Extracellular Nucleotides and Nucleosides: Release, Receptors, and Physiological and Pathophysiological Effects* (Schwiebert, E. M, Ed), pp. 31-58. Academic Press, Amsterdam, New York, Tokyo.
- (6) King, A. E.; Ackley, M. A.; Cass, C. E.; Young, J. D. and Baldwin, S. A. (2006): Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharm. Sci.* 27: 416-425.
- (7) HOYLE, C. H. V.; HILDERMAN, R. H.; PINTOR, J. J.; SCHLÜTER, H. and KING, B. F. (2001): Diadenosine polyphosphates as extracellular signal molecules. *Drug Develop. Res.* 52: 260-273.
- (8) DELICADO, E. G.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; CARRASQUERO, L. M. G.; LEON, D.; PÉREZ-SEN, R. and GUALIX, J. (2006): Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 452: 563-572.
- (9) MARUYAMA, K. (1991): The discovery of adenosine triphosphate and the establishment of its structure. *J. Hist. Biol.* 24: 145-154.
- (10) DRURY, A. N. and SZENT-GYÖRGYI, A. (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol-London* 68: 213-237.
- (11) GILLESPIE, J. H. (1934): The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J. Physiol. London.* 80: 345-359.
- (12) FANTL, P. and WARD, H. A. (1956): Nucleotides in human platelets. *Biochem. J.* 64: 747-754.
- (13) DA PRADA, M.; PLETCHER, A.; TRANZER, J. P. and KNUCHEL, H. (1967): Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine and histamine in blood platelets. *Nature.* 216: 315-317.
- (14) FALCK, B.; HILLARP, N.-Å. and HÖGBERG, B. (1956): Content and intracellular distribution of adenosine triphosphate in cow adrenal medulla. *Acta Phys. Scand.* 36: 360-376.
- (15) BLASCHKO, H.; BORN, G. V. R.; D'IORIO, A. and EADE, N. R. (1956): Observations on the distribution of catecholamines and adenosine triphosphate in the bovine adrenal medulla. *J. Physiol. Lond.* 133: 548-557.

- (16) SCHÜMANN, H. J. (1968): Noradrenalin and ATP content of sympathetic nerves. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 233: 296-300.
- (17) DOWDALL, M. J.; BOYNE, A. F. and WHITTAKER, V. P. (1974): Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.* 140: 1-12.
- (18) ZIMMERMANN, H. (1994): Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17: 420-426.
- (19) ZIMMERMANN, H. and WHITTAKER, V. P. (1974): The effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of *Torpedo*: A combined biochemical, electrophysiological and morphological study. *J. Neurochem.* 22: 435-450.
- (20) ZIMMERMANN, H. (1982): Coexistence of adenosine 5'-triphosphate and acetylcholine in the electromotor synapse. In: Co-Transmission (Cuello A. C. Ed), pp. 243-259. The MacMillan Press, London.
- (21) MANN, T. (1945): Studies on the metabolism of semen 1. General aspects. Occurrence and distribution of cytochrome, certain enzymes and coenzymes. *Biochem. J.* 39: 451-458.
- (22) ROHSTEIN, A. and MEIER, R. (1948): The relationship of the cell surface to metabolism. I. Phosphatases in the cell surface of living yeast cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 32: 77-95.
- (23) CLARKSON, E. M. and MAIZELS, M. (1952): Distribution of phosphatase in human erythrocytes. *J. Physiol. London.* 116: 112-128.
- (24) ACS, G.; OSTROWSKI, W. and STRAUB, F. B. (1954): [Adenylpyrophosphatase activity on the surface of ascites tumor cells]. *Acta Physiol. Hung.* 6: 261-263.
- (25) ENGELHARDT, W. A. (1958): Enzymes as structural elements of physiological mechanisms. *I. U. B. Symposium Series.* 2: 163-168.
- (26) WENKSTERN, T. W. and ENGELHARDT, W. A. (1959): [The adenosine polyphosphatase localized on the surface of nucleated red corpuscles]. *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.* 76: 422-431.
- (27) ABOOD, L. G. and GERARD, R. W. (1954): Enzyme distribution in isolated particles of rat peripheral nerve. *J. Cell Physiol.* 43: 379-392.
- (28) WACHSTEIN, M. and MEISEL, E. (1957): Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 13-23.
- (29) ESSNER, E.; NOVIKOFF, A. B. and MASEK, B. (1958): Adenosine triphosphatase and 5'-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 711-716.
- (30) KAM, W.; CLAUSER, E. M.; KIM, Y. S.; KAN, Y. W. and RUTTER, W. J. (1985): Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8715-8719.
- (31) VAN DRIEL, I. R.; WILKS, A. F.; PIETERSZ, G. A. and GODING, J. W. (1985): Murine plasma cell membrane antigen PC-1: Molecular cloning of cDNA and analysis of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8619-8623.
- (32) MISUMI, Y.; OGATA, S.; HIROSE, S. and IKEHARA, Y. (1990): Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-

- terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *J. Biol. Chem.* 265: 2178-2183.
- (33) MAENHAUT, C.; VAN SANDE, J.; LIBERT, F.; ABRAMOWICZ, M.; PARMENTIER, M.; VANDERHAEGEN, J. J.; DUMONT, J. E.; VASSART, G. and SCHIFFMANN, S. (1990): RDC8 codes for an adenosine receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1169-1178.
- (34) LUSTIG, K. D.; SHIAU, A. K.; BRAKE, A. J. and JULIUS, D. (1993): Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5113-5117.
- (35) WEBB, T. E.; SIMON, J.; KRISHEK, B. J.; BATESON, A. N.; SMART, T. G.; KING, B. F.; BURNSTOCK, G. and BARNARD, E. A. (1993): Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324: 219-225.
- (36) BRAKE, A. J.; WAGENBACH, M. J. and JULIUS, D. (1994): New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* 371: 519-523.
- (37) VALERA, S.; HUSSY, R. J.; EVANS, N.; ADAMI, R.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. and BUELL, G. (1994): A new class of ligand gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature.* 371: 516-519.
- (38) WANG, T. F. and GUIDOTTI, G. (1996): CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- (39) KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J. B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A. R.; BACH, F. H. and ROBSON, S. C. (1996): Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- (40) ZIMMERMANN, H. (2001): Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56.
- (41) ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J. and ZIMMERMANN, H. (2006): The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling.* 2: 409-430.
- (42) GODING, J. W.; GROBBEN, B. and SLEGERS, H. (2003): Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *BBA. Mol. Basis. Dis.* 1638: 1-19.
- (43) STEFAN, C.; JANSEN, S. and BOLLEN, M. (2006): Modulation of purinergic signaling by NNP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling.* 2: 361-370.
- (44) TERKELTAUB, R. (2006): Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing in calcification. *Purinergic Signalling.* 2: 371-377.
- (45) MILLAN, J. L. (2006): Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling.* 2: 335-341.
- (46) MILLAN, J. L. (2006): Mammalian alkaline phosphatases. From biology to applications in medicine and biotechnology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany.

- (47) FREDHOLM, B. B.; ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; DALY, J. W.; HARDEN, T. K.; JACOBSON, K. A.; LEFF, P. and WILLIAMS, M. (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 143-156.
- (48) ZIMMERMANN, H.; BEAUDOIN, A. R.; BOLLEN, M.; GODING, J. W.; GUIDOTTI, G.; KIRLEY, T. L.; ROBSON, S. C. and SANO, K. (2000): Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. in: *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases* (van Duffel, L., Lemmens, R. Eds), pp. 1-8. Shaker Publishing BV, Maastricht.
- (49) CHAMPAGNE, E.; MARTÍNEZ, L. O.; COLLET, X. and BARBARAS, R. (2006): Ecto-F₁F₀ ATP synthase/F₁ ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr. Opin. Lipidol.* 17: 279-284.
- (50) DEAGLIO, S. and MALAVASI, F. (2006): The CD38/CD157 mammalian gene family: An evolutionary paradigm for other leucocyte surface enzymes. *Purinergic Signalling.* 2: 431-441.
- (51) ZIMMERMANN, H. (1992): 5'-Nucleotidase - molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365.
- (52) BIANCHI, V. and SPYCHALA, J. (2003): Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 278: 46195-46198.
- (53) YEGUTKIN, G. G.; HENTTINEN, T.; SAMBURSKI, S. S.; SPYCHALA, J. and JALKANEN, S. (2002): The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem. J.* 367: 121-128.
- (54) PICHER, M. and BOUCHER, R. C. (2003): Human airway ecto-adenylate kinase - A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J. Biol. Chem.* 278: 11256-11264.
- (55) BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J. G. and SÉVIGNY, J. (2004): Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry USA.* 43: 5511-5519.
- (56) VORHOFF, T.; ZIMMERMANN, H.; PELLETIER, J.; SÉVIGNY, J. and BRAUN, N. (2005): Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signalling.* 1: 259-270.
- (57) KIRLEY, T. L.; CRAWFORD, P. A. and SMITH, T. M. (2006): The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. *Purinergic Signalling.* 2: 379-389.
- (58) IVANENKOV, V. V.; MELLER, J. and KIRLEY, T. L. (2005): Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): Implications for NTPDase structural modeling. *Biochemistry USA.* 44: 8998-9012.
- (59) MASSÉ, K.; EASON, R.; BHAMRA, S.; DALE, N. and JONES, E. A. (2006): Comparative genomic and expression analysis of the conserved NTPDase gene family in *Xenopus*. *Genomics.* 87: 366-381.

- (60) ZIMMERMANN, H. (2001): Ecto-nucleotidases. in: Handbook of Experimental Pharmacology. Purinergic and Pyrimidergic Signalling. (Abbracchio, M. P. and Williams, M. Eds), pp. 209-250 Springer Verlag, Heidelberg.
- (61) BRAUN, N.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C.; ENJOJI, K.; GUCKELBERGER, O.; HAMMER, K.; DI VIRGILIO, F. and ZIMMERMANN, H. (2000): Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/*cd39* expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4357-4366.
- (62) BRAUN, N. and ZIMMERMANN, H. (2001): Microglial ectonucleotidases: Identification and functional roles. *Drug Develop. Res.* 53: 208-217.
- (63) BRAUN, N.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C.; HAMMER, K.; HANANI, M. and ZIMMERMANN, H. (2004): Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia.* 45: 124-132.
- (64) BRAUN, N.; SÉVIGNY, J.; MISHRA, S.; ROBSON, S. C.; BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R.; HAMMER, K. and ZIMMERMANN, H. (2003): Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1355-1364.
- (65) SHUKLA, V.; ZIMMERMANN, H.; WANG, L.; KETTENMANN, H.; RAAB, S.; HAMMER, K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C. and BRAUN, N. (2005): Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80: 600-610.
- (66) SMITH, T. M. and KIRLEY, T. L. (1998): Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1386: 65-78.
- (67) LAVOIE, É. G.; KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; LECKA, J. and SÉVIGNY, J. (2004): Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1917-1926.
- (68) KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; LAVOIE, É. G.; LECKA, J.; BIGONNESSE, F.; KNOWLES, A. F.; ROBSON, S. C.; KIRLEY, T. L. and SÉVIGNY, J. (2005): Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling.* 1: 193-204.
- (69) GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W. and BOLLEN, M. (2001): Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 276: 1361-1368.
- (70) ZALATAN, J. G.; FENN, T. D.; BRUNGER, A. T. and HERSCHLAG, D. (2006): Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: Implications for mechanism and evolution. *Biochemistry USA.* 45: 9788-9803.
- (71) VOLLMAYER, P.; CLAIR, T.; GODING, J. W.; SANO, K.; SERVOS, J. and ZIMMERMANN, H. (2003): Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur. J. Biochem.* 270: 2971-2978.
- (72) ROTLLÁN, P.; ASENSIO, A. C.; RAMOS, A.; RODRÍGUEZ-FERRER, C. R. and OAKNIN, S. (2002): Ectoenzymatic hydrolysis of the signalling nucleotides diadenosine polyphosphates. *Recent Res. Devel. Biochem.* 3: 191-209.
- (73) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; GUALIX, J.; MATEO, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; CASTRO, E. and PINTOR, J. (1999): Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog. Brain Res.* 120: 397-409.

- (74) DENNIS, J.; NOGAROLI, L. and FUSS, B. (2005): Phosphodiesterase-I alpha/autotaxin (PD-I alpha/ATX): A multifunctional protein involved in central nervous system development and disease. *J. Neurosci. Res.* 82: 737-742.
- (75) DE BACKER, M.; MCSWEENEY, S.; RASMUSSEN, H. B.; RIISE, B. W.; LINDLEY, P. and HOUGH, E. (2002): The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *J. Mol. Biol.* 318: 1265-1274.
- (76) YEGUTKIN, G. G.; MIKHAILOV, A.; SAMBURSKI, S. S. and JALKANEN, S. (2006): The detection of micromolar pericellular ATP pool on lymphocyte surface by using lymphoid ecto-adenylate kinase as intrinsic ATP sensor. *Mol. Biol. Cell.* 17: 3378-3385.
- (77) SCHULTZ-HEIENBROK, R.; MAIER, T. and STRÄTER, N. (2005): A large hinge bending domain rotation is necessary for the catalytic function of *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. *Biochemistry USA.* 44: 2244-2252.
- (78) STRÄTER, N. (2006): Ecto-5'-Nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signalling.* 2: 343-350.
- (79) CUNHA, R. A. (2001): Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem. Res.* 26: 979-991.
- (80) KOSZALKA, P.; OZUYAMAN, B.; HUO, Y. Q.; ZERNECKE, A.; FLOGEL, U.; BRAUN, N.; BUCHHEISER, A.; DECKING, U. K. M.; SMITH, M. L.; SÉVIGNY, J.; GEAR, A.; WEBER, A. A.; MOLOJAVYI, A.; DING, Z. P.; WEBER, C.; LEY, K.; ZIMMERMANN, H.; GODECKE, A. and SCHRADER, J. (2004): Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ. Res.* 95: 814-821.
- (81) SCHUBER, F. and LUND, F. E. (2004): Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr. Mol. Med.* 4: 249-261.
- (82) SEMAN, M.; ADRIOUCH, S.; HAAG, F. and KOCH-NOLTE, F. (2004): Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): Emerging actors in cell communication and signaling. *Curr. Medicinal. Chem.* 11: 857-872.
- (83) ALVARADO-CASTILLO, C.; HARDEN, T. K. and BOYER, J. L. (2005): Regulation of P2Y₁ receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol. Pharmacol.* 67: 114-122.
- (84) MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSPOULOS, J. H. F.; ISLAM, N.; PINSKY, D. J.; SESTI, C. and LEVI, R. (2003): Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: Implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305: 9-16.
- (85) SÉVIGNY, J.; SUNDBERG, C.; BRAUN, N.; GUCKELBERGER, O.; CSIZMADIA, E.; QAWI, I.; IMAI, M.; ZIMMERMANN, H. and ROBSON, S. C. (2002): Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood.* 99: 2801-2809.
- (86) ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJOYOJI, K. and ROBSON, S. C. (2006): Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Molec. Dis.* 36: 217-222.

- (87) JHANDIER, M. N.; KRUGLOV, E. A.; LAVOIE, É. G.; SÉVIGNY, J. and DRANOFF, J. A. (2005): Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J. Biol. Chem.* 280: 22986-22992.
- (88) ENJOJI, K.; SÉVIGNY, J.; LIN, Y.; FRENETTE, P.; CHRISTIE, P. D.; SCHULTE, A. M.; ESCH, J.; IMAI, M.; EDELBERGER, J. M.; RAYBURN, H.; LECH, M.; BEELER, D. M.; CSIZMADIA, E.; WAGNER, D. D.; ROBSON, S. C. and ROSENBERG, R. D. (1999): Targeted disruption of *cd39*/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med.* 5: 1010-1017.
- (89) MIZUMOTO, N.; KUMAMOTO, T.; ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; MATSUE, H.; ENJOJI, K. and TAKASHIMA, A. (2002): CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nature Med.* 8: 358-365.
- (90) NARISAWA, S.; HUANG, L.; IWASAKI, H.; HASEGAWA, H.; ALPERS, D. H. and MILLAN, J. L. (2003): Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7525-7530.
- (91) NARISAWA, S.; FRÖHLANDER, N. and MILLAN, J. L. (1997): Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Develop. Dynam.* 208: 432-446.
- (92) FEDDE, K. N.; BLAIR, L.; SILVERSTEIN, J.; COBURN, S. P.; RYAN, L. M.; WEINSTEIN, R. S.; WAYMIRE, K.; NARISAWA, S.; MILLAN, J. L.; MACGREGOR, G. R. and WHYTE, M. P. (1999): Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* 14: 2015-2026.
- (93) HESSLE, L.; JOHNSON, K. A.; ANDERSON, H. C.; NARISAWA, S.; SALI, A.; GODING, J. W.; TERKELTAUB, R. and MILLAN, J. L. (2002): Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 9445-9449.
- (94) ANDERSON, H. C.; HARMAY, D.; CAMACHO, N. P.; GARIMELLA, R.; SIPE, J. B.; TAGUE, S.; BI, X. H.; JOHNSON, K.; TERKELTAUB, R. and MILLAN, J. L. (2005): Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/ nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Amer. J. Pathol.* 166: 1711-1720.
- (95) VAN MEETEREN, L. A.; RUURS, P.; STORTELERS, C.; BOUWMAN, P.; VAN ROOIJEN, M. A.; PRADERE, J. P.; PETTIT, T. R.; WAKELAM, M. J. O.; SAULNIER-BLACHE, J. S.; MUMMERY, C. L.; MOOLENAAR, W. H. and JONKERS, J. (2006): Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5015-5022.
- (96) COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. and THOMPSON, L. F. (2006): Physiological roles of ecto-5'-nucleotidase. *Purinergic Signalling.* 2: 351-360.
- (97) COCKAYNE, D. A.; MUCHAMUEL, T.; GRIMALDI, J. C.; MULLERSTEFFNER, H.; RANDALL, T. D.; LUND, F. E.; MURRAY, R.; SCHUBER, F. and HOWARD, M. C. (1998): Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 92: 1324-1333.

- (98) SUN, L.; IGBAL, J.; DOLGILEVICH, S.; YUEN, T.; WU, X. B.; MOONGA, B. S.; ADEBANJO, O. A.; BEVIS, P. J.; LUND, F.; HUANG, C. L.; BLAIR, H. C.; ABE, E. and ZAIDI, M. (2003): Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption. *FASEB J.* 17: 369-375.
- (99) ITOH, M.; ISHIHARA, K.; HIROI, T.; LEE, B. O.; MAEDA, H.; IJIMA, H.; YANAGITA, M.; KIYONO, H. and HIRANO, T. (1998): Deletion of bone marrow stromal antigen-1 (CD157) gene impaired systemic thymus independent-2 antigen-induced IgG3 and mucosal TD antigen-elicited IgA responses. *J. Immunol.* 161: 3974-3983.
- (100) SALMI, M. and JALKANEN, S. (2005): Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Rev. Immunol.* 5: 760-771.
- (101) BURCH, L. H. and PICHER, M. (2006): E-NTPDases in human airways regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinergic Signalling.* 2: 399-408.
- (102) VLAJKOVIC, S. M.; VINAYAGA-MOORTHY, A.; THORNE, P. R.; ROBSON, S. C.; WANG, C. J. H. and HOUSLEY, G. D. (2006): Noise-induced up-regulation of NTPDase3 expression in the rat cochlea: Implications for auditory transmission and cochlear protection. *Brain Res.* 1104: 55-63.
- (103) GENDRON, F. P.; BENREZZAK, O.; KRUGH, B. W.; KONG, Q.; WEISMAN, G. A. and BEAUDOIN, A. R. (2002): Purine signaling and potential new therapeutic approach: Possible outcome of NTPDase inhibition. *Current Drug Targets.* 3: 229-245.
- (104) KENNEDY, C.; WESTFALL, T. D. and SNEDDON, P. (1996): Modulation of purinergic neurotransmission by ecto-ATPase. *Semin. Neurosci.* 8: 195-199.
- (105) WESTFALL, T. D.; KENNEDY, C. and SNEDDON, P. (1997): The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 329: 169-173.
- (106) DRAKULICH, D. A.; SPELLMON, C. and HEXUM, T. D. (2004): Effect of the ecto-ATPase inhibitor, ARL 67156, on the bovine chromaffin cell response to ATP. *Eur. J. Pharmacol.* 485: 137-140.
- (107) GENDRON, F. P.; HALBFINGER, E.; FISCHER, B.; DUVAL, M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. and BEAUDOIN, A. R. (2000): Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: Chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. *J. Med. Chem.* 43: 2239-2247.
- (108) IQBAL, J.; VOLLMAYER, P.; BRAUN, N.; ZIMMERMANN, H. and MÜLLER, C. E. (2005): A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the screening of inhibitors by in-capillary enzymatic microreactions. *Purinergic Signalling.* 1: 349-358.
- (109) MÜLLER, C. E.; IQBAL, J.; BAQI, Y.; ZIMMERMANN, H.; RÖLICH, A. and STEPHAN, H. (2006) Polyoxometalates - a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Biorog. Med. Chem. Lett.* 16: 5943-5947.

- (110) HEINE, P.; BRAUN, N. and ZIMMERMANN, H. (1999): Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* 262: 102-107.
- (111) HOFFMANN, C.; HEINE, P.; PRADEL, G.; KIM, Y.-C.; JACOBSON, K. A. and ZIMMERMANN, H. (2000): Inhibition of ecto-apyrase and ecto-ATPase by pyridoxal phosphate-related compounds. *Drug. Dev. Res.* 51, 153-158.
- (112) MCDougALL, K.; PLUMB, C.; KING, W. A. and HAHNEL, A. (2002): Inhibitor profiles of alkaline phosphatases in bovine preattachment embryos and adult tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 415-422.
- (113) WALL, K. A.; KLIS, M.; KORNET, J.; COYLE, D.; AMÉ, J. C. and JACOBSON, M. K. (1998): Inhibition of the intrinsic NDA⁺ glycohydrolase activity of CD38 by carbocyclic NAD analogues. *Biochem. J.* 335: 631-636.
- (114) FIELDS, R. D. and BURNSTOCK, G. (2006): Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 423-436.
- (115) ZIMMERMANN, H. (2006): Ecto-nucleotidases in the nervous system. *Novartis Found. Symp.* 275: 113-128.
- (116) ZIMMERMANN, H. (1996): Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.
- (117) DUNWIDDIE, T. V.; DIAO, L. H. and PROCTOR, W. R. (1997): Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 7673-7682.
- (118) CUNHA, R. A.; SEBASTIÃO, A. M. and RIBEIRO, J. A. (1998): Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A₁ receptors. *J. Neurosci.* 18: 1987-1995.
- (119) MASINO, S. A.; DIAO, L. H.; ILLES, P.; ZAHNISER, N. R.; LARSON, G. A.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B. B. and DUNWIDDIE, T. V. (2002): Modulation of hippocampal glutamatergic transmission by ATP is dependent on adenosine A₁ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 356-363.
- (120) ARAQUE, A. and PEREA, G. (2004): Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia.* 47: 241-248.
- (121) NEWMAN, E. A. (2004): Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia.* 47: 268-274.
- (122) FÄRBER, K. and KETTENMANN, H. (2006): Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 452: 615-621.
- (123) TSUDA, M.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; MIZOKOSHI, A.; KOHSAKA, S.; SALTER, M. W. and INOUE, K. (2003): P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature.* 424: 778-783.
- (124) PINSKY, D. J.; BROEKMAN, M. J.; PESCHON, J. J.; STOCKING, K. L.; FUJITA, T.; RAMASAMY, R.; CONNOLLY, E. S.; HUANG, J.; KISS, S.; ZHANG, Y.; CHOUDHRI, T. F.; MCTAGGART, R. A.; LIAO, H.; DROPOULOS, J. H. F.; PRICE, V. L.; MARCUS, A. J. and MALISZEWSKI, C. R. (2002): Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 109: 1031-1040.
- (125) THOMPSON, L. F.; ELTZSCHIG, H. K.; IBLA, J. C.; VAN DE WIELE, C. J.; RESTA, R.; MOROTE-GARCILA, J. C. and COLGAN, S. P. (2004): Crucial role for ecto-5'-

- nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 200: 1395-1405.
- (126) ZIMMERMANN, H. (2006): Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 452: 573-588.
- (127) MISHRA, S. K.; BRAUN, N.; SHUKLA, V.; FÜLLGRABE, M.; SCHOMERUS, C.; KORF, H.-W.; GACHET, C.; IKEHARA, Y.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C. and ZIMMERMANN, H. (2006): Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development.* 133: 675-684.
- (128) MILOSEVIC, J.; BRANDT, A.; ROEMUSS, U.; ARNOLD, A.; WEGNER, F.; SCHWARZ, S. C.; STORCH, A.; ZIMMERMANN, H. and SCHWARZ, J. (2006): Uracil nucleotides stimulate human neural precursor cell proliferation and dopaminergic differentiation: involvement of MEK/ERK signalling. *J. Neurochem.* 99: 913-923.

————— *Artículo original* —————

Glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid Assay are affected by P2X agonist BzATP

Recibido el 23 de abril de 2007

PATRICIA MARÍN-GARCÍA, JESÚS SÁNCHEZ-NOGUEIRO,
DAVID LEÓN*

*Department of Biochemistry, Veterinary Faculty,
Universidad Complutense de Madrid. Spain*

ABSTRACT

Amplex Red (AR) reagent is the most stable and sensitive fluorogenic substrate known for horseradish peroxidase (HRP). Thus, in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2), AR (a nonfluorescent compound) is converted to resorufin (a strongly fluorescing product) by the action of HRP. In the last years, multiple assays have been developed using this reagent to quantify a diverse assortment of analyses and also to detect the activity of many different enzymes. We recently showed that BzATP, agonist of several ionotropic nucleotide receptors (P2X), interfered with Amplex Red oxidation catalyzed by HRP. In the present work we reported that glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit are also strongly interfered by BzATP. These data are really interesting because demonstrate that resorufin fluorescence, in the presence of BzATP, is not proportional to glutamate concentration and, therefore, it must not be used as method to measure glutamate concentration.

Key words: Amplex Red.—Glutamate.—P2X.—BzATP.—Interferences.

* Contact information: David León Navarro.
Department of Biochemistry, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid, Spain.

Telf.: 34-91-394-3894. Fax: 34-91-394-3909.

E-mail: daleon@vet.ucm.es

RESUMEN

Las determinaciones de glutamato utilizando Amplex Red Glutamic Acid Assay están afectadas por el agonista P2X BzATP

El compuesto Amplex Red (AR) es el sustrato fluorogénico para la peroxidasa de rábano (HRP) más estable y sensible. Así, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el AR (un compuesto no fluorescente) es convertido en resorufina (un producto fuertemente fluorescente) por la acción de la HRP. En los últimos años se han realizado muchos ensayos utilizando este compuesto para cuantificar un variado surtido de análisis, así como para detectar la actividad de muchas y variadas enzimas. Recientemente hemos demostrado que el BzATP, un agonista de varios receptores ionotrópicos de nucleótidos (P2X), interfiere con la oxidación del Amplex Red catalizada por la HRP. En el presente trabajo mostramos que las determinaciones de glutamato utilizando el kit Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay están fuertemente interferidas por el BzATP. Estos datos son realmente interesantes porque demuestran que la fluorescencia de la resorufina, en presencia del BzATP, no es proporcional a la concentración de glutamato y, por lo tanto, no debe ser utilizada como un método para medir la concentración de glutamato.

Palabras clave: Amplex Red.—Glutamato.—P2X.—BzATP.—Interferencias.

INTRODUCTION

Amplex Red (AR) reagent is the most stable and sensitive fluorogenic substrate known for horseradish peroxidase (1). A variety of novel fluorogenic and chromogenic assays for enzymes that produce hydrogen peroxide has been developed using this compound. Thus, these coupled assays permit the ultrasensitive quantitation of a diverse assortment of analytes, including glucose, galactose, cholesterol, glutamic acid, xanthine (or hypoxanthine), uric acid, choline, acetylcholine and hydrogen peroxide, as well as to detect the activity of many different enzymes (e.g. phospholipase D, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, sphingomyelinase, ...) (Table 1).

We recently have reported that the precision of such determinations are affected by the presence in the medium of the ATP analog, BzATP (2'-3'-o-(4-benzoylbenzoyl)-adenosine 5'-triphosphate), an agonist of the ionotropic P2 receptors, P2X₁, P2X₂,

P2X₃ and P2X₇ (2, 3). Thus, we showed that AR, in the absence of H₂O₂, was quickly oxidized when BzATP was present. Furthermore, we obtained first evidences that glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit were also strongly interfered by BzATP by using individual measurements in a fluorescence emission spectra (LS55 spectrofluorimeter from Perkin Elmer). In the present work we showed how this interference can lead to misinterpret the results and, therefore, to hypothesize effects that do not correlate with the ones mediated through ionotropic nucleotide receptors (P2X) in biological systems.

TABLE 1. *Examples of Amplex Red-based assays. The limits of detection of the corresponding metabolites or enzymatic activities are shown*

<i>Metabolite</i>	<i>Enzymatic Activity</i>
Amplex Red Catalase Assay Kit	50 mU/ mL
Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit	1.2 x10 ⁻⁵ U/mL
Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit 10 nM	40 μU/mL
Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit 3 μM	0.05 mU/mL
Amplex Red Galactose/Galactose Oxidase Assay Kit 4 μM	2 mU/mL
Amplex Red Cholesterol Assay Kit 5 ng/mL	
Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit 0.3 μM	0.002 U/mL
Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit 20 nM	0.2 mU/mL
Amplex Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay Kit 200 nM	0.1 mU/mL

METHODS

Culture of granule cells

All experiments carried out at the Universidad Complutense of Madrid followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Cerebellar cultures were

prepared following procedures described by León *et al.* (2006) (4). Cerebella from three Wistar rat pups (P7) were removed aseptically, washed once in Earl's balanced salt solution (EBSS; Gibco BRL), cut into small pieces and transferred to a screw cap tube. Tissue fragments were allowed to settle, excess EBSS was aspirated, and 4 mL of EBSS containing 100 U/mL DNase (Worthington, Lake Wood NJ), 2.5 mM CaCl₂ and 2.5 mM MgCl₂ were added. Sixty-five units of papain (Worthington) were added after it was preactivated (30 min at 37° C) in 1 mL of EBSS. Air in the tube was displaced with 95% O₂-5% CO₂ and the tube was incubated at 37° C for 40 minutes on a shaking platform. Undigested fragments were allowed to settle and the supernatant was centrifuged at 208 g for 5 min. The pellet was resuspended in 3 mL of EBSS containing 4.5 mg of ovomucoid protease inhibitor layered onto an albumin cushion, which consisted of 3 mL of EBSS containing ovomucoid protease inhibitor (Worthington) and ovalbumin (Worthington) at 15 mg/mL each, and the resuspended pellet was centrifuged at 172 g for 5 min. The resulting pellet was finally resuspended in Neurobasal medium (Gibco BRL) and the cell number and viability was assessed. The dissociated cells were plated at a final density of 0.1-0.3 X 10⁶ cells/cm² on poly-L-lysine-coated glass coverslips or 24-wells plates (2 cm² surface area/well) in Neurobasal medium supplemented with B27 (Gibco, BRL), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B (Sigma), 21 mM KCl and 2 mM glutamine (Sigma), and were maintained in a humidified incubator at 37° C in 5 % CO₂. After 24 hours Neurobasal medium was replaced by new fresh medium containing 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B, 21 mM KCl and 0.5 mM glutamine. The culture medium was replaced every 3 days afterwards.

Glutamate release experiments

For the glutamate release experiments, cerebellar granule neurons were plated at a final density of 0.3 X 10⁶ cells/cm² on 24-wells plates (2 cm² surface area/well) pre-coated with 0.1 mg/mL poly-L-lysine (Biochrom AG, Berlin). 7 to 14 days-old cells were washed twice and incubate for 1 hour at 37° C with Locke's solution. 5 minutes before

to start the experiment, Locke's solution was changed by a new one containing 50 μM PDC in order to block the glutamate reuptake systems. Then, granule neurons were stimulated for 1 min with BzATP (100 nM-200 μM) in Locke's solution without Mg^{2+} . All stimulations were performed in the presence of 3 U/ml of ADA in order to avoid the presence of adenosine in the medium. Finally, the medium was aspirated and the glutamate content was measured using the Amplex Red Glutamic Acid Assay Kit (Molecular Probes) according to the protocol provided by the manufacturer. The resorufin fluorescence was detected with a BMG Labtechnologies 96 plate reader using excitation filter at 544 nM and emission filter at 590 nM.

Analyses of membrane pore formation

To analyze whether BzATP induced pore formation, cultured granule cells (14 days old) were exposed for 5 min with BzATP (without Mg^{2+}) in presence of 2 μM YO-PRO-1, the cell-impermeant dye, that becomes fluorescent when interacting with DNA. Changes in fluorescence were continuously monitored using a fluorescence microscopy setting excitation wavelength at 490 nm and emission at 510 nm. At the end of each experiment positive control was carried out making permeable granule cell with 10% triton X-100.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments. Comparisons between experimental samples and controls were carried out using Student's t-test. Dose-response curve showing the effect of BzATP on glutamate release were fitted using GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California.

RESULTS AND DISCUSSION

Previous works have shown that P2X₇ receptor activation, and also reported for P2X₄, P2X₂, P2X₂/P2X₃, can lead to open a large pore through which glutamate can reach the extracellular medium (5, 6). Since P2X₇ is highly expressed in granule neurons where distributed, mainly, along neuronal fibers (7) we decided to measure glutamate content in the extracellular media following P2X₇ receptor activation in order to test whether P2X₇ receptor could also open a pore in these cells. Thus, granule neurons growth in culture for 14 days were stimulated with BzATP for 1 minute and the glutamate content was measured using the Amplex Red Glutamic Acid Assay Kit (Molecular Probes) according to the protocol provided by the manufacturer.

The quantification of glutamate using the Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit provides an ultrasensitive method for detecting glutamic levels as low as 10 nM. We also tried to measure the glutamate release utilising the enzyme-linked fluorometric assay based on glutamate dehydrogenase activity and the changes in the fluorescence of NADPH (8), but the glutamate content in the media was under the limits of detection by this technique (data not shown). As it can be observed in Figure 1 the principle of the assay is based

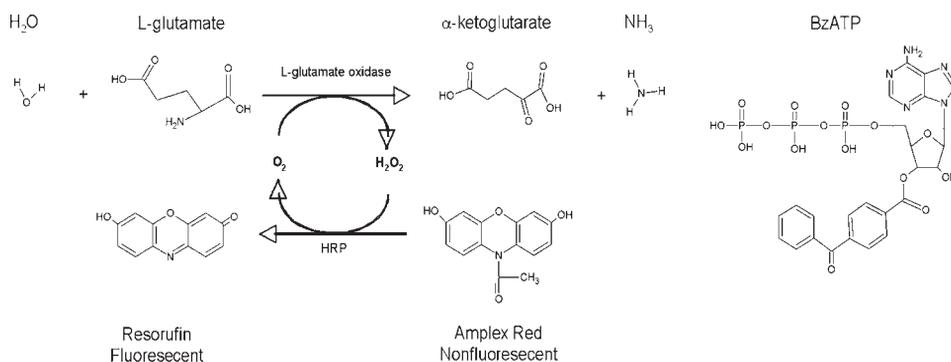


FIGURE 1. **Principle of coupled enzymatic assays using Amplex Red reagent.** Oxidation of L-Glutamate by glutamate oxidase results in generation of H₂O₂, which is coupled to conversion of the Amplex Red reagent to fluorescent resorufin by HRP. The detection scheme shown here is used in Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit.

in the oxidation of L-glutamic acid by glutamate oxidase to produce α -ketoglutarate, NH_3 and H_2O_2 . In a subsequent reaction H_2O_2 is reduced by horseradish peroxidase (HRP) using Amplex red reagent (10-acetyl-3, 7 dihydroxiphenoxazine) as an electron donor which is transformed to resorufin, a fluorescent compound that has excitation/emission maxima of $\sim 540/585$ nm.

Following the indications of the protocol, a working solution, containing $50 \mu\text{M}$ AR, 0.125 U/ml HRP, 0.04 U/ml L-glutamate oxidase, 0.25 U/ml L-glutamate pyruvate transaminase and $100 \mu\text{M}$ L-alanine in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer, was prepared. Next, several concentrations of L-Glu (100 nM- $4 \mu\text{M}$) were added and incubated at 37°C for 30 min. Finally, resorufin fluorescence was detected with a BMG Labtechnologies 96 plate reader using excitation filter at 544 nm and emission filter at 590 nm. As it can be observed in Figure 2, the resorufin fluorescence was glutamate concentration-dependent in the range assayed.

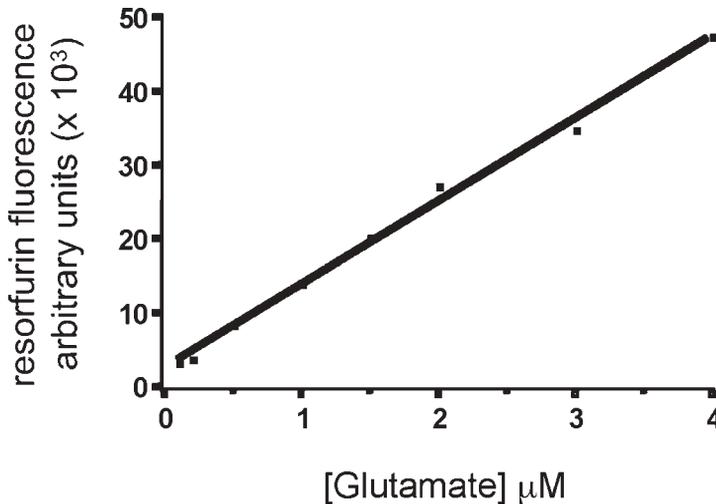


FIGURE 2. *Detection of L-glutamic acid using the Amplex® Red reagent-based assay.* Each reaction contained $50 \mu\text{M}$ Amplex® Red reagent, 0.125 U/mL HRP, 0.04 U/mL L-glutamate oxidase, 0.25 U/mL L-glutamate-pyruvate transaminase, $100 \mu\text{M}$ L-alanine and the indicated amount of L-glutamic acid in $1X$ reaction buffer. Reactions were incubated at 37°C . After 30 minutes, resorufin fluorescence was detected with a BMG Labtechnologies 96 plate reader using excitation filter at 544 nm and emission filter at 590 nm.

Once we knew that resorufin fluorescence was dose-dependent in the range nano-micromolar of glutamate, we decided to investigate if extracellular glutamate could increase in response to pore formation after P2X₇ receptor activation. For that purpose, granule neurons (14 days old) were stimulated for 1 min with several concentrations of BzATP (100 nM-200 μM), in absence of magnesium, since this ion has been shown to inhibit P2X₇ receptor (2). Next, medium was taken and the glutamate content was measured using Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit. As it can be observed in Figure 3a, BzATP induced an increase in resorufin fluorescence that was dose-dependent. Initially, these data seems to indicate that BzATP induced pore formation through which glutamate reached extracellular medium since the profile of glutamate release did not fit to a saturation kinetic. To verify this hypothesis, granule neurons were stimulated with BzATP and ATP in presence of YO-PRO-1 as indicated in methods section. The lack of variations in the YO-PRO-1 fluorescence after granule cell exposure to BzATP (100 μM) or ATP (100 μM) for 5 minutes discarded the possibility that prolonged activation of P2X₇ could induce pore formation in the plasma membrane of granule neurons (Figure 3b). Therefore, the non-saturable profile of the dose-response curve was caused by the presence of BzATP in the incubation medium and not by a lineal glutamate release through pore.

In a recent work (9) we showed that BzATP, and other molecules that contain 4-benzoylbenzoyl groups in their structure, interfere in the AR oxidation reaction catalyzed by HRP. Thus, BzATP enhances the AR oxidation mediated by HRP in the absence of externally added H₂O₂. This effect is produced by benzophenone group of BzATP molecule since other ATP agonists did not reproduce BzATP interferences (9). Therefore, we decided to investigate if resorufin fluorescence increase observed in Figure 3 could be a consequence of BzATP interference on Amplex Red oxidation. For that purpose, a working solution containing 50 μM AR, 0.125 U/ml HRP, 0.04 U/ml L-glutamate oxidase, 0.25 U/ml L-glutamate pyruvate transaminase and 100 μM L-alanine was prepared following the protocol of Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit. This working solution was supplemented with 0.1 μM, 0.5 μM and 1 μM L-Glu respectively and incubated for 30 min at 37° C. Resorufin

fluorescence showed the following values, showed in Figure 4: Glu 0.1 μM , 909 ± 128 a.u. ($n = 3$); Glu 0.5 μM , 2713 ± 347 a.u. ($n = 3$); Glu 1 μM , 5621 ± 257 a.u. ($n = 3$). All these values were significantly enhanced in presence of 10 μM BzATP (Glu 0.1 μM , 1851 ± 304 a.u., $n = 3$, $p < 0.01$; Glu 0.5 μM 4362 ± 294 a.u., $n = 3$, $p < 0.01$; Glu 1 μM , 806551 ± 407 a.u., $n = 3$, $p < 0.01$) and 100 μM BzATP (Glu 0.1 μM , 5904 ± 935 a.u., $p < 0.001$; Glu 0.5 μM 8216 ± 1103 a.u., $p < 0.001$; Glu 1 μM 12371 ± 461 a.u., $p < 0.001$).

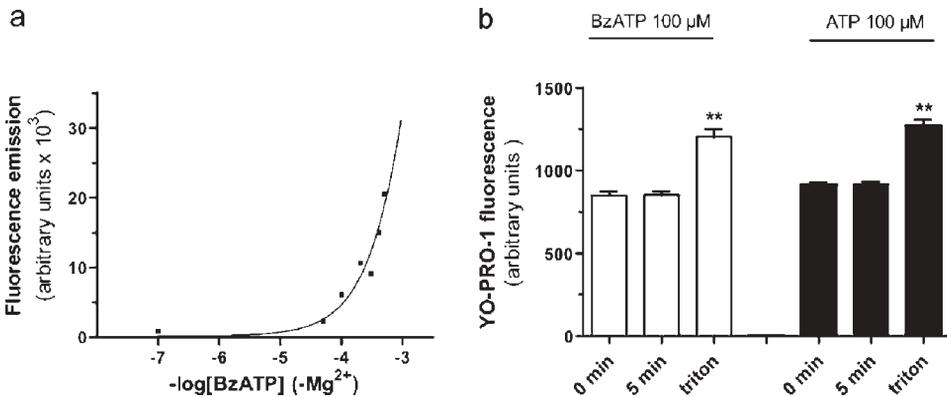


FIGURE 3. **(a)** BzATP interferes with Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit. Granule neurons (14 days old) were stimulated for 1 min with several concentrations of BzATP (100 nM-200 μM), in absence of magnesium, and the medium was taken and the glutamate content was measured using Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit. As it can be observed in this graph, BzATP induced an increase in resorufin fluorescence that was dose-dependent. **(b)** Graph show that neither BzATP nor ATP stimulation induce pore formation in granule neurons in culture. As positive control, granule neurons were permeabilized with triton and an increase in YOPRO fluorescence could be detected.

Data reported in this work confirm that BzATP interferes the measurement of glutamate using Amplex® Red Glutamic Acid/ Glutamic Oxidase Assay Kit. Thus, the measurement of glutamate in the media after stimulation with BzATP seems to indicate that P2X induced pore formation through which glutamate reached extracellular medium. However, the resorufin fluorescence was not due to an increase in glutamate content but BzATP interfered on Amplex Red oxidation catalyzed by HRP. These data are really

interesting because demonstrate that resorufin fluorescence, in the presence of BzATP, is not proportional to glutamate concentration and, therefore, it must not be used as method to measure glutamate concentration. This recommendation is applicable to the large variety of assays that also used Amplex Red for quantitating specific biological compounds (cholesterol, galactose, glucose, ...) or enzymes (monoamine oxidase, PLD, ...).

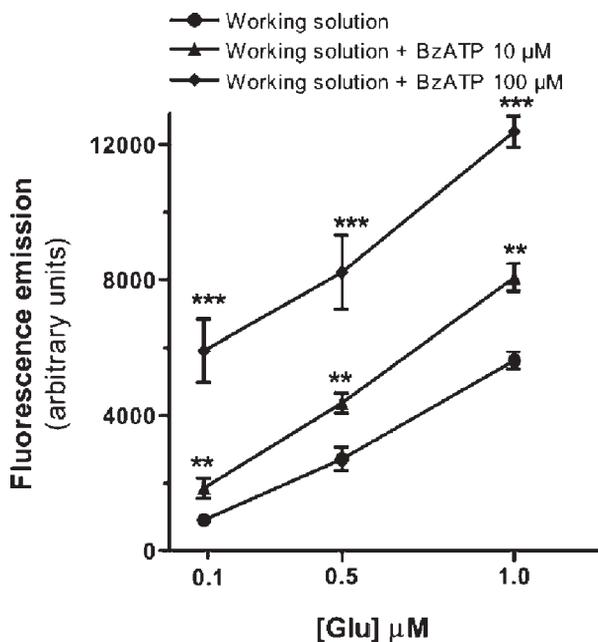


FIGURE 4. *Glutamate determination using Amplex[®] Red Glutamic Acid/ Glutamic Oxidase Assay Kit in absence or presence of BzATP.* A working solution containing 100 μM Amplex[®] Red reagent, 0.25 U/mL HRP, 0.08 U/mL L-glutamate oxidase, 0.5 U/mL L-glutamate-pyruvate transaminase, and 200 μM L-alanine was supplemented with different glutamate concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM) alone or with BzATP (10 and 100 mM). After incubation at 37 $^{\circ}$ C, resorufin fluorescence was measured as indicated in methods section.

In that sense, in a recent report Kukley *et al.* (10) showed that catabolism of BzATP, and subsequent adenosine A₁ receptor activation, depressed field potentials (fEPSP) at hippocampal synapses. This conclusion was reached analysing BzATP hydrolysis

by diphosphohydrolases and nucleotidases and measuring the amount of inorganic phosphate released with amplex red based-Pi Per Phosphate Assay Kit. However, they incubated together BzATP and HRP to know the phosphate concentration. Thus, in agreement with the results obtained in this work it could be possible that resorufin fluorescence resulted affected by BzATP and not corresponded, therefore, completely to BzATP catabolism. Similarly, Parvathenani *et al.* (11) studied the role played by P2X₇ receptor in superoxide production in primary microglia. Thus, superoxide (O₂⁻) was measured indirectly through the detection of hydrogen peroxide (H₂O₂) by using an Amplex Red based assay. Thus, microglia cells were stimulated with BzATP in a 96-well plate containing 0.2 units/mL horseradish peroxidase and 50 μM Amplex Red. It is relevant to indicate that Amplex Red and BzATP were incubated together. Accordingly to the results reported in this work where HRP-mediated Amplex Red oxidation, in presence of BzATP, is not proportional to H₂O₂ formed, it seems logical to hypothesize that resorufin fluorescence detected by Parvathenani and co-workers are not completely due to superoxide production but BzATP-mediated resorufin production could also be involved.

In summary, the measurement of glutamate concentration by Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamic Oxidase Assay Kit results altered when BzATP is present in the medium. Thus, Amplex Red oxidation catalyzed by HRP is significantly enhanced by BzATP, even in absence of H₂O₂. Taking into account that Amplex Red oxidation by HRP is a shared reaction in Amplex Red-based assays, extra caution is needed to take when these assays are used with BzATP in order to avoid misinterpretations of the results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Education and Science BFU2005-02079, CAM (SAL/0551/2004), Fundación La Caixa n.º BM05-114-0 and Fundación Marcelino Botín. David León is a postdoctoral fellow of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha and Fondo Social Europeo.

REFERENCES

- (1) ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N. and R. P. HAUGLAND, R. P. (1997): A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* 253: 162-168.
- (2) NORTH, R. A. (2002): Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.
- (3) BIANCHI, B. R.; LYNCH, K. J.; TOUMA, E.; NIFORATOS, W.; BURGARD, E. C.; ALEXANDER, K. M.; PARK, H. S.; YU, H.; METZGER, R.; KOWALUK, E.; JARVIS, M. F. and VAN BIESEN, T. (1999): Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376: 127-138.
- (4) LEÓN, D.; HERVÁS, C. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2006): P2Y and P2X receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2999-3013.
- (5) SURPRENANT, A.; RASSENDREN, F.; KAWASHIMA, E.; NORTH, R. A. and BUELL, G. (1996): The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science.* 272: 735-738.
- (6) DUAN, S.; ANDERSON, C. M.; KEUNG, E. C.; CHEN, Y.; CHEN, Y. and SWANSON, R. A. (2003): P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 23: 1320-1328.
- (7) HERVÁS, C.; PÉREZ-SEN, R. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2003): Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 73: 384-399.
- (8) NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S. and SÁNCHEZ-PRIETO, J. (1987): Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49: 50-57.
- (9) LEÓN, D.; MARÍN-GARCÍA, P.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; ORTEGA DE LA O, F.; GARCÍA-CARMONA, F. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2007): P2X agonist BzATP interferes with Amplex Red coupled fluorescence assays *Anal. Biochem.* DOI: 10.1016/j.ab.2007.03.038
- (10) KUKLEY, M.; STAUSBERG, P.; ADELMANN, G.; CHESSELL, I. P. and DIETRICH, D. (2004): Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on hippocampal mossy fibers by P2X₇ receptor agonist 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP. *J. Neurosci.* 24: 7128-7139.
- (11) PARVATHENANI, L. K.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECO, C. R.; ROBERTS, S. B.; ROBERTSON, B. and POSMANTUR, R. (2003): P2X₇ mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 13309-13317.

————— *Artículo original* —————

Efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células β pancreáticas en el feto: implicación del sistema de IGFs

Recibido el 26 de febrero de 2007

ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN¹, M. ÁNGELES MARTÍN ARRIBAS², CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, España.*

²*Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España*

RESUMEN

Los fetos a término procedentes de ratas gestantes sometidas a una restricción proteico-calórica del 65% de la ingesta diaria de alimento (S) presentan un incremento de la masa de células β e hiperinsulinemia. Los procesos metabólicos y moleculares implicados en estas alteraciones no han sido estudiados hasta este momento. Con este fin valoramos los efectos inmediatos de la restricción proteico-calórica sobre los mecanismos que regulan la funcionalidad y el crecimiento de las células β durante el desarrollo fetal. Los resultados indican que: 1) La restricción nutricional en los fetos provoca alteraciones de la secreción de insulina, consecuencia de cambios en los niveles de expresión del gen de insulina y su contenido.

Extracto del trabajo de investigación original que obtuvo el Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia del año 2006.

* **Información de contacto:**

Doctora Carmen Álvarez Escolá.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid.

E-mail: calvarez@farm.ucm.es

Fax: 91 394 17 79

La alteración en la expresión del mRNA de insulina parece ser debida a un incremento de p38/SAPK2 y de la oxidación de glucosa, implicados ambos en la activación del factor de transcripción PDX-1. 2) El incremento en la masa de células β encontrado en los fetos S podría relacionarse con una mayor estimulación de la replicación de células β , debido al aumento del IGF-1 pancreático, del número de IGF-1R y de una mayor activación, tanto en situación basal como tras la estimulación con glucosa/IGF-1 de la vía de señales IRS-2/PI3K/Akt.

Palabras clave: Malnutrición.—Islote.—Insulina.—Señalización.—Sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2).

ABSTRACT

Effect of maternal undernutrition on fetal pancreatic β -cell development, growth and functionality: involvement of the IGF system.

We have previously shown that Wistar fetuses from protein-caloric undernourished (U) pregnant rats at 21 days post coitum (dpc) exhibit increased β -cell mass and hyperinsulinemia. The metabolic and molecular processes involved in these alterations are not fully understood. To this end, we examined the immediate effects of a protein-caloric restricted diet on the mechanisms that regulate both the functionality and growth of the β -cells during fetal development. The data show that: 1) Food restriction causes in fetuses alterations in glucose-stimulated insulin secretion as a consequence of changes in the levels of insulin gene expression and content. Altered insulin mRNA expression seems to be caused by the increase in p38/SAPK2 protein levels and glucose oxidation, both of them implicated in the activation of the insulin gene transcription factor PDX-1. 2) The increased β -cell mass found in U fetuses could be related to a higher stimulation of β -cell replication, due to locally increased pancreatic IGF-1, the elevated number of IGF-1R and the enhancement in both basal and glucose/IGF-1 activations of the IRS-2/PI3K/Akt pathway.

Key words: Malnutrition.—Islet.—Insulin.—Signalling.—Insulin receptor substrate-2 (IRS-2).

INTRODUCCIÓN

1. Efecto de la subnutrición sobre las células β

Mantener un estado nutricional adecuado es de vital importancia, pero adquiere una consideración crítica cuando se ve alterado en periodos de crecimiento. De hecho, desde hace tiempo se consi-

dera el bajo peso al nacer como un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 y de otras enfermedades que no se manifiestan clínicamente hasta la edad adulta. Las razones para establecer esta relación se basan, fundamentalmente, en la hipótesis del «fenotipo ahorrador» lanzada por Hales y Barker en 1992 (1), según la cual la subnutrición intrauterina y durante la infancia afecta adversamente el desarrollo y función de las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans.

Esta teoría ha sido testada experimentalmente en numerosos modelos animales. En función del tipo de restricción nutricional aplicada a la madre varían los mecanismos implicados en las modificaciones estructurales y funcionales que sufre el páncreas endocrino de sus fetos. En este sentido, se ha visto que someter a las ratas gestantes a una dieta hipoproteica (8% de proteínas) conduce a la formación, en fetos a término, de islotes más pequeños y menos vascularizados, con menos células β y con menor contenido de insulina que los de los animales controles (20% de proteínas). Asimismo, la liberación de insulina en respuesta a secretagogos, tales como glucosa o aminoácidos, está dañada en estos islotes (2).

Con respecto a la malnutrición global, también se han descrito alteraciones en la estructura del páncreas endocrino, disminución de la masa de células β y del contenido de insulina pancreática (3, 4). Otros autores, sin embargo, han encontrado la situación contraria, incremento en la masa de células β , así como del contenido insulínico (5), en paralelo a un aumento de la respuesta insulino-secretora de los islotes fetales (5, 6). Esta última situación se asemeja a lo que ocurre en fetos procedentes de ratas gestantes que padecen una diabetes moderada, los cuales se caracterizan por tener no sólo incrementado el contenido de insulina pancreática, sino también la secreción de insulina en respuesta a glucosa, además de una mayor proliferación de células β (7).

En cualquier caso, la subnutrición en la etapa fetal en todos estos modelos provoca cambios estructurales y funcionales en el páncreas endocrino capaces de llevar a una alteración de la homeostasis glucídica en la etapa adulta (8).

A la vista de los resultados obtenidos con los distintos modelos de malnutrición materna se puede concluir que las condiciones intraute-

rinas adversas condicionan el desarrollo fetal y el peso al nacer, pudiendo llegar a inducir una tendencia diabetogénica en la descendencia. Por estas razones se debe reconocer que la subnutrición, al igual que la obesidad, juega un papel importante en la etiopatogénesis de la diabetes. Es por tanto apropiado decir que la diabetes está relacionada con los dos extremos de un mismo concepto, la nutrición.

2. Control nutricional de la función de la célula β

Las principales funciones de la célula β , secreción y producción de insulina, están controladas por nutrientes y de todos ellos la glucosa es el regulador fisiológico más importante. Esta regulación requiere que la glucosa se metabolice en el interior de las células β , como consecuencia de lo cual se generan una serie de intermediarios metabólicos capaces de controlar el índice de expresión del gen de insulina, la síntesis de la hormona y la secreción de la misma.

La glucosa es capaz de regular la producción de insulina en tan sólo unos minutos, fundamentalmente a través de la traducción del mRNA preexistente. De este modo, la célula β puede reponer rápidamente sus reservas insulínicas, siendo capaz así de responder a las oscilaciones diarias de los niveles circulantes de glucosa. Sin embargo, una exposición más prolongada (24 horas) de las células β a elevadas concentraciones de glucosa conduce a un aumento de la estabilidad del mRNA de la hormona y de la transcripción del gen que la codifica, capacitando así a la célula β a responder a cambios dietéticos más mantenidos en el tiempo como, por ejemplo, periodos de ayuno.

Debido a que la célula β pancreática es la única célula del organismo capaz de sintetizar insulina, contiene como tal la maquinaria adecuada para este fin. Uno de los elementos claves en la regulación, por parte de la glucosa, de la expresión del gen de insulina es el factor de transcripción pancreático PDX-1 (9), el cual está implicado además, en la transcripción de otros genes como son el GLUT-2 y la glucocinasa.

La glucosa afecta la distribución intracelular del PDX-1 a través de un proceso fosforilación-activación en el que interviene una cas-

cada de señales que implica la participación de la proteína kinasa 2 activada por estrés (p38/SAPK2) y de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) (10) (Figura 1). La proteína kinasa p38/SAPK2 es un miembro de la familia de las MAP kinasas que se activan en respuesta a estímulos adversos, tales como el calor, el choque osmótico, la luz ultravioleta o citocinas proinflamatorias, que son producidas durante condiciones de estrés. En las células β , la activación por glucosa de la vía de la p38/SAPK2 implica la participación de PI3K, mientras que en la activación por el estrés no (11).

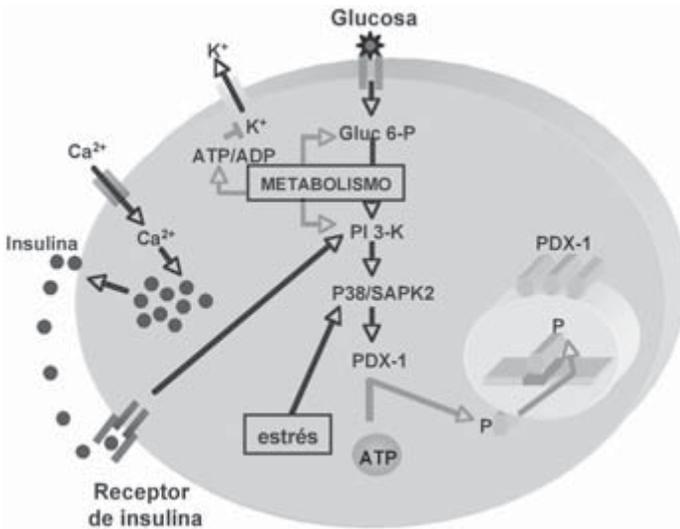


FIGURA 1. *Función de PDX-1 en la expresión del gen de insulina en las células β pancreáticas y su regulación por glucosa.*

3. Crecimiento de la masa de células β

El páncreas endocrino está sujeto a cambios dinámicos en función de la demanda de insulina, de modo que la masa de células β puede modificarse tanto en número (hiperplasia), como en tamaño celular (hipertrofia), e incluso, si fuese necesario, aumentar o disminuir su funcionalidad con el fin de mantener los niveles de glucemia del organismo dentro de un estrecho rango fisiológico (revisado en 12).

Fundamentalmente, se puede decir que la masa de células β es el resultado de un fino balance entre factores que inducen a su crecimiento, como son el índice de replicación y de neogénesis, y el proceso de muerte celular programada o apoptosis.

3.1. *Factores que modulan el crecimiento de las células β : Sistema de IGFs*

Los factores implicados en la plasticidad del páncreas incluyen desde nutrientes como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres, hasta hormonas tales como la insulina, la hormona del crecimiento (GH) o el glucagón, e incluso factores de crecimiento como los similares a la insulina (IGFs). Estos y otros factores son capaces de suprimir o estimular el crecimiento de las células β , su supervivencia, diferenciación y secreción de insulina.

Entre los factores de crecimiento mejor caracterizados y más relevantes desde el punto de vista fisiológico cabe destacar el sistema de IGFs. La familia de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) incluye dos ligandos (IGF-1 e IGF-2), dos receptores de membrana (IGF-1R e IGF-2R) y al menos seis proteínas distintas de unión a los IGFs (IGFBP-1 a IGFBP-6), que regulan la actividad de los IGFs en numerosos tejidos (revisado en 13).

En muchas especies, ambos IGFs son detectados en la circulación fetal desde el principio de la gestación, si bien las concentraciones plasmáticas del IGF-2 son muy superiores a las del IGF-1, llegando a desaparecer en roedores la expresión de IGF-2 de la mayoría de los tejidos alrededor del periodo de destete (14). El predominio del IGF-2 durante el periodo embrionario permite considerarle como el principal responsable del crecimiento fetal. Por el contrario, los niveles plasmáticos de IGF-1 aumentan rápidamente después del nacimiento, fundamentalmente como consecuencia de su producción hepática estimulada por GH (revisado en 15).

Los IGFs juegan un importante papel en el crecimiento feto-placentario. Desempeñan acciones de carácter metabólico y mitogénico, así como de diferenciación celular en un amplio abanico de tejidos fetales (revisado en 13). Pero además de estimular la proliferación

celular, está demostrado que tanto el IGF-1 como el -2 previenen la apoptosis. En los roedores, las células β del páncreas endocrino sufren un proceso de muerte celular programada o apoptosis alrededor del tiempo de destete, lo que es seguido de un incremento en el proceso de neogénesis (14). Esta secuencia de destrucción y renovación celular coincide con una caída en la expresión génica de IGF-2 y con un cambio de células β fetales capaces de replicar a otras no-proliferantes con respuesta insulínica secretora propia de los individuos adultos. En trabajos realizados en animales transgénicos que sobreexpresan IGF-2 se ha descrito una reducción de la apoptosis característica de este periodo y un incremento de la masa de células β (16).

Hay que señalar que la expresión génica de los IGFs está regulada de modo específico para cada tejido y puede verse afectada por las condiciones nutricionales y endocrinas que se den en el ambiente intrauterino, si bien estas condiciones tienen, generalmente, un efecto más pronunciado sobre los niveles del IGF-1 que del IGF-2, independientemente de la causa o naturaleza de la alteración alimentaria u hormonal (17).

3.2. *Vías de señales de la glucosa e IGF-1 implicadas en el crecimiento y/o supervivencia de las células β*

El IGF-1 estimula la proliferación de las células β del páncreas de los mamíferos a través de su receptor, el IGF-1R, y la consecuente activación de toda una cascada de transducción de señales. Cuando el IGF-1 se une al IGF-1R se activa la actividad tirosina kinasa intrínseca del receptor, lo que conlleva su autofosforilación y la fosforilación en tirosina de diversas proteínas intracelulares, entre las que se incluye la familia de sustratos específicos del receptor de insulina (IRSs), siendo especialmente importante en las células β el IRS-2. Una vez fosforilado, el IRS-2 queda anclado a los residuos de fosfotirosina de la subunidad β del IGF-1R a través de su dominio PTB situado en la región N-terminal. El IRS-2, entonces, es capaz de secuestrar a la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) a través del dominio SH2 de su subunidad reguladora, la p85, provocando, a su vez, la activación de la subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La PI3K activada transforma los fosfatidilinositoles difosfato (PIP₂) de la

membrana plasmática, en fosfatidilinositoles trifosfato (PIP_3), los cuales actúan como mensajeros secundarios activando a la proteína kinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y a determinadas isoformas de la proteína kinasa C (PKC). La PDK activa, a continuación, a la proteína kinasa B (PKB, también denominada Akt) y a varias isoformas atípicas de la PKC. La Akt es una serina/treonina kinasa que tiene una gran cantidad de proteínas sustrato entre las que se incluye la glucógeno sintasa kinasa-3 (GSK3), cuya actividad es inhibida por fosforilación; por el contrario, tiene otras dianas que al ser fosforiladas se activan, como la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), que a su vez media la activación de la p70S6K y de la 4E-BP1 implicadas, ambas, en la síntesis de proteínas. La Akt puede también fosforilar directamente en serina/treonina a determinados factores de transcripción, los cuales por su parte contribuyen a promover la entrada en el ciclo celular.

Por otro lado, la unión del IGF-1 con su receptor provoca también la activación de la ruta de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Esta activación se logra por la interacción de la proteína adaptadora Grb-2 con las tirosinas fosforiladas del receptor de IGF-1 o del IRS-2, a través de sus dominios SH2, o por la unión de proteínas Shc. A su vez, Grb-2 se une a mSOS, una molécula intercambiadora de los nucleótidos de guanina de la proteína Ras, la cual resulta activada por esta acción. La forma Ras-GTP se une a Raf, la cual fosforila entonces a la kinasa MEK, resultando en la fosforilación-activación de Erk-1/2. La activación de las Erks o p42/44MAPK conduce a la activación de otra kinasa, la p90RSK, lo que induce la translocación de ésta al núcleo o bien, las propias Erks pueden directamente translocarse ellas mismas. En el núcleo fosforilarán a determinados factores de transcripción favoreciendo la mitogénesis y la transcripción de diversos genes como el de insulina.

La activación de la ruta de las MAPKs y de la PI3K es un requisito esencial para la mitogénesis de la mayoría de las células de los mamíferos.

Es importante destacar que la actividad de los IGFs es dependiente del metabolismo de la glucosa. Además, la glucosa puede activar la vía de transducción de señales mediada por los IRSs, independientemente de estos factores de crecimiento (18). Se ha visto

que concentraciones estimulantes de glucosa (6-18 mM), pueden promover la asociación de IRS-2 con la subunidad reguladora p85 de la PI3K, o de IRS-2 con Grb2/mSOS (18). Por otro lado, la glucosa puede conducir, de modo no-dependiente de IRS-2, a la activación de Erk-1/2 y de p70S6K.

4. Objetivos

En nuestro grupo de trabajo se ha puesto a punto un modelo animal de subnutrición proteico-energética que reproduce una situación muy similar a la que padecen los seres humanos en países del Tercer Mundo: se comienza en una etapa temprana del desarrollo y se continúa hasta la edad adulta. En trabajos previos realizados en dicho modelo (5) se ha mostrado que una restricción del 65% de la ingesta a la madre durante la tercera semana de gestación aumenta, en los fetos a término, la masa de células β y la respuesta insulino-secretora a glucosa y aminoácidos. Los procesos metabólicos y moleculares responsables de todas estas alteraciones causadas por la malnutrición global no han sido analizados hasta el momento. En este sentido, creemos que nuestro modelo de subnutrición nos brinda una oportunidad única para valorar *in vivo* e *in vitro* los mecanismos que regulan la funcionalidad y crecimiento de las células β durante el desarrollo fetal y puede ayudarnos a profundizar en la comprensión de la fisiología del páncreas endocrino y de las patologías que lo afectan. Con este fin nos hemos planteado estudiar: 1) Los efectos de la subnutrición materna sobre los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la funcionalidad de las células β de los fetos a término; 2) Los efectos de la restricción global sobre el crecimiento de las células β pancreáticas en periodo fetal y valorar la posible implicación del sistema de IGFs; 3) Caracterizar las vías de señales de la glucosa e IGF-1 implicadas en el crecimiento de las células β durante la etapa fetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y dieta

A lo largo de este trabajo se han utilizado ratas de la raza Wistar sometidas a un ciclo de luz/oscuridad automático. El inicio de la gestación fue establecido al día siguiente del apareamiento mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata. Desde el día 14 de gestación se limita la cantidad de pienso administrado diariamente a un 35% del valor ingerido por las ratas controles.

Todas las determinaciones se realizaron en fetos a término (21,5 dpc) subnutridos, comparando los resultados obtenidos con los de sus correspondientes animales controles alimentados *ad libitum*. Para la recogida de las muestras, los animales fueron sacrificados alrededor de las 10:00 horas, cuando se encontraban en periodo postabsorptivo. Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo los criterios indicados en la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada en National Institutes of Health (NIH).

2. Aislamiento y cultivo primario de islotes de langerhans fetales

Los islotes fetales se obtienen a partir de páncreas (7-9) de fetos a término y según la técnica descrita por Hellerström y cols. (19). Los islotes así obtenidos se cultivaron durante distintos periodos de tiempo según los experimentos a realizar.

3. Secreción y contenido de insulina de los islotes

Para valorar la función secretora, los islotes fetales procedentes de cultivo primario son sometidos a una incubación estática en una solución tampón-bicarbonato que contiene albúmina bovina (5 mg/ml; Fracción V; SIGMA) y las distintas concentraciones de glucosa a evaluar: 2,8 mM y 16,7 mM. La incubación se lleva a cabo durante

90 minutos, a 37° C y con agitación. Después de la incubación se recoge el sobrenadante que se conserva a -20° C hasta el momento de valorar, mediante RIA, la cantidad de insulina liberada por los islotes.

Para determinar el contenido de insulina, grupos de veinte islotes fetales primarios son recogidos en 0,5 ml de una mezcla ácido-alcohol (75% de etanol, 1,5% de ácido clorhídrico 12 N y 23,5% de agua destilada). Posteriormente, son sonicados y el extracto que se obtiene se conserva a -20° C hasta su valoración mediante RIA.

4. Metabolismo de la glucosa

La determinación del metabolismo de la glucosa se llevó a cabo en islotes fetales procedentes de cultivo primario siguiendo el método descrito por Malaisse y Sener (20).

Como marcadores radiactivos se usaron D-[5-³H]-glucosa y D-[6-¹⁴C]-glucosa (Amersham-Pharmacia). La liberación de ³H₂O a partir de D-[5-³H]-glucosa nos proporciona la medida de la utilización global de la molécula, mientras que su oxidación viene dada por la producción de ¹⁴CO₂ a partir de D-[6-¹⁴C]-glucosa. Ambos productos fueron determinados en un contador de centelleo líquido (1209 Rackbeta, LKB WALLAC).

5. Análisis de proteínas mediante western-blot

Los extractos de proteínas se obtienen a partir de grupos de islotes primarios que se recogen sobre hielo y se sonicán durante un minuto en tampón de lisis (Tris 12,5 mM; EGTA 1,25 mM; EDTA 1,25 mM; Triton X-100 0,25%; PMSF 2 mM; Leupeptina 10 μM; Na₃VO₄ 2 mM; Benzamidina 2 mM y Aprotinina 10 μg/ml). En ocasiones, para aumentar la sensibilidad, se hace necesario llevar a cabo una inmunoprecipitación de las muestras, cuya finalidad es la separación de una proteína específica del extracto de proteínas totales.

El análisis cuantitativo de las proteínas se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford (21). Las proteínas se separan en un

gel de poliacrilamida y posteriormente, son transferidas electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Después se incuba ésta con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20) a 4° C durante toda la noche.

Tras esta incubación se lava con TTBS y se añade el anticuerpo secundario con el que se incuba la membrana durante una hora con agitación suave y a temperatura ambiente. Posteriormente se vuelve a lavar. Para visualizar los inmunocomplejos se utiliza una técnica de quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences, UK).

6. Análisis del RNA total

6.1. *Northern blot*

El RNA total se extrae siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi (22), basado en la utilización de una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol, Gibco Life Technologies).

Una vez cuantificado, la cantidad necesaria de RNA total es sometida a Northern blot siguiendo el método anteriormente descrito (23). El cDNA correspondiente a la sonda de insulina, de tamaño 399 pares de bases, fue cedido generosamente por S. J. Chan; University of Chicago, USA.

Las prehibridaciones e hibridaciones se realizan basándose en el método de Amasino (24) y como control de carga se usa la sonda ribosomal de 18S. Terminado el proceso, las membranas se introducen en una placa de autorradiografía para exponer, el tiempo adecuado, una película de rayos X a -80° C (Kodak OMAT X-AR) que, posteriormente, se revela utilizando un revelador Agfa, Curix 60.

6.2. *Ensayo de protección de las ribonucleasas*

Las muestras de RNA total se obtuvieron y valoraron siguiendo el método descrito anteriormente (22). Se utilizaron 20 µg de RNA

de cada muestra que se dejaron precipitando en 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol puro a -20° C hasta el momento de su análisis.

Los cDNAs correspondientes a las sondas de IGF-1 e IGF-2 de rata han sido generosamente cedidas por los doctores C. T. Roberts Jr. y D. LeRoith (National Institute of Health, Bethesda, MD). El cDNA correspondiente a la sonda de 18S ribosomal se usa como control de carga (pT7 RNA 18S antisense, Ambion, Austin, Texas).

Para el marcaje radiactivo de las sondas con ($^{32}\alpha$ -P) dUTP (ICN, Nuclear Iberica, Madrid, España) se sigue el protocolo indicado en el kit Riboprobe Gemini II core system (Promega, Madison, WI, USA). La hibridación del RNA total con la ribsonda marcada ha sido descrito anteriormente (25) y los híbridos formados se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida empleando el sistema Sequigen II Sequencing Cell de BioRad.

Una vez finalizada la electroforesis se mantiene el gel a -80° C en contacto con una película sensible el tiempo necesario.

7. Estudios inmunohistoquímicos

El índice de replicación de células β ha sido valorado *in vitro* en cultivo primario de islotes fetales. La replicación de células β se mide añadiendo BrdU al medio de cultivo hasta una concentración final de 100 μ mol/l y después de una hora se recogen los islotes bajo lupa, se incluyen en agarosa y una vez solidificada ésta, en parafina. A continuación, los bloques de parafina se cortan con un microtomo en finas secciones de 7 μ m de espesor, cada una de las cuales es fijada a continuación con calor sobre un portaobjetos. A un intervalo fijo de cada 72 secciones se procede al doble marcaje del tejido, frente a la insulina y frente a la BrdU (kit de proliferación celular de Amersham).

La valoración cuantitativa se lleva a cabo mediante un microscopio Olympus BX40. El índice de proliferación de células β viene expresado por la relación porcentual de células β que han incorporado la BrdU en función del número total de células β .

8. Técnicas analíticas

8.1. Determinación de glucosa e insulina en plasma

Para la determinación de glucosa, el plasma obtenido es desproteínizado con la mezcla de Somogyi [SO_4Zn 0,08 M, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,08 M] y, a continuación, se centrifuga durante cinco minutos a 2.500 rpm. La glucosa se analizó en el sobrenadante aplicando el método de la glucosa-oxidasa acoplado a la oxidación de un cromógeno (BioSystems).

La insulinemia se valoró por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un kit suministrado por la casa Linco (LINCO Research Inc., USA). Se parte de una sensibilidad de 0,1 ng/ml en la curva patrón y se usaron 100 μl de suero de cada muestra.

8.2. Determinación de IGFs en suero

El **IGF-1** en suero se mide por enzimoimmunoanálisis (EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA). La determinación sérica de **IGF-2** se lleva a cabo por el análisis de radiorreceptor (RRA). Para el marcaje radiactivo de la hormona con ^{125}I se utiliza una modificación del método de la cloramina T (26) y como hormona se utiliza IGF-2 recombinante humano de R&D Systems (Abingdon, UK). En ambos casos, el método incorpora un pretratamiento de las muestras para evitar interferencias de las IGFBPs.

8.3. Determinación de la proliferación celular

Para valorar *in vitro* la proliferación de islotes fetales inducida por glucosa y por el factor de crecimiento IGF-1 se usa un kit de enzimoimmunoanálisis colorimétrico (Roche Diagnostics), basado en la medida de la incorporación de BrdU durante la síntesis de DNA *de novo*.

Se recogen grupos de 25 islotes fetales procedentes de cultivo primario que se llevan a una placa de cultivo donde se adiciona el medio correspondiente a cada condición [RPMI-1640 con glutamina suplementado con 3 mM ó 17 mM de glucosa, con o sin IGF-1

(100 ng/ml) y 1% de antibióticos]. Al día siguiente se añade la BrdU (concentración final: 10 μ M) y se incuban los islotes durante veinte horas a 37° C y 5% CO₂. Pasado el periodo de incubación se aplica el protocolo indicado en el kit.

9. Cálculos estadísticos

Los resultados obtenidos se expresan como la media aritmética de cada serie de valores y su error estándar (E.S.). Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia de dos medias, se utiliza la «*t*» de Student. En el caso en el que se comparen más de dos medias, el cálculo del grado de significación estadística se determina mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

RESULTADOS

Características generales de los animales (Tabla 1)

El estudio *in vitro* de la respuesta insulino-secretora de los islotes fetales mostró que la liberación de insulina en la población subnutrida respecto a la control era mayor en las dos condiciones estudiadas. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que los fetos procedentes de madres subnutridas tienen unos valores de insulínemia y contenido de insulina por islote, significativamente superior a los de fetos controles. Por lo tanto, para comparar los niveles relativos de insulina liberada por los islotes, controles y subnutridos, la secreción de insulina fue normalizada en función del contenido por islote de la misma, encontrándose que la liberación de insulina era similar en ambas poblaciones, lo que parecía indicar que la subnutrición afectaba el contenido de insulina pero no el mecanismo secretor de la hormona.

La valoración de la oxidación de glucosa en el ciclo de Krebs puso de manifiesto una importante estimulación de la ruta oxidativa mitocondrial de la glucosa en la población subnutrida.

TABLA 1. *Características generales de fetos a término procedentes de madres controles y subnutridas. Los datos se expresan como la media \pm E.S. Número de datos 12-14*

	<i>Control</i>	<i>Subnutridas</i>
Peso corporal (g)	5,04 \pm 0,05	4,17 \pm 0,09a
Peso páncreas (mg)	20,01 \pm 0,43	17,51 \pm 0,53a
Glucemia (mg/100 ml)	51,4 \pm 3,1	52,1 \pm 1,7
Insulinemia (μ U insulina/ml)	171,3 \pm 10,2	218,1 \pm 9,7a
Contenido de insulina por islote (μ U insulina/islote)	1.541 \pm 93	3.144 \pm 117a
Glucosa 2,8 mM	1,24 \pm 0,042	1,18 \pm 0,06
Secreción de insulina (% contenido de insulina por islote)		
Glucosa 16,7 mM	2,85 \pm 0,17b	3,13 \pm 0,13b
Glucosa 2,8 mM	3,31 \pm 0,22	3,70 \pm 0,16
Oxidación de D-(6- ¹⁴ C)glucosa (pmol/islote/120 min.)		
Glucosa 16,7 mM	5,11 \pm 0,17b	9,03 \pm 0,33ab

^ap < 0,05 relativo a ratas controles, ^bp < 0,05 relativo a glucosa 2,8 mM.

Estudio de la expresión del mRNA de insulina

El análisis densitométrico del mRNA pancreático de insulina mostró que la subnutrición provocaba un aumento de cuatro veces en los niveles del mismo en relación a lo encontrado en los fetos controles (Figura 2).

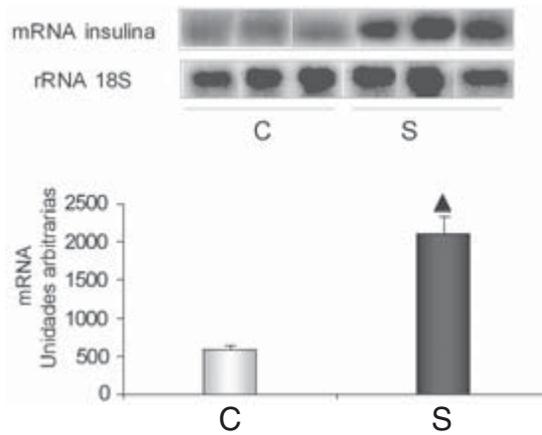


FIGURA 2. *Análisis mediante Northern blot de los niveles del mRNA de insulina en páncreas de fetos controles (C) y subnutridos (S). Se cargaron 30 µg de mRNA total por experimento. La carga fue normalizada por hibridación con la sonda de la subunidad 18S ribosomal. Los datos se expresan como unidades arbitrarias de la media ± E.S. de cinco experimentos independientes. ▲p < 0,05 relativo a ratas controles.*

Dado que la expresión del gen de insulina estimulada por glucosa está regulada por el factor de transcripción PDX-1, el cual a su vez es activado por la PI3K y la p38/SAPK2, valoramos los niveles de estas tres proteínas. Los resultados de las Figuras 3A y B muestran que los niveles proteicos de PDX-1 y p85(PI3K) fueron similares entre la población control y subnutrida, mientras que el contenido en islote de p38/SAPK2 se vio incrementado significativamente como consecuencia de la restricción nutricional (Figura 3C).

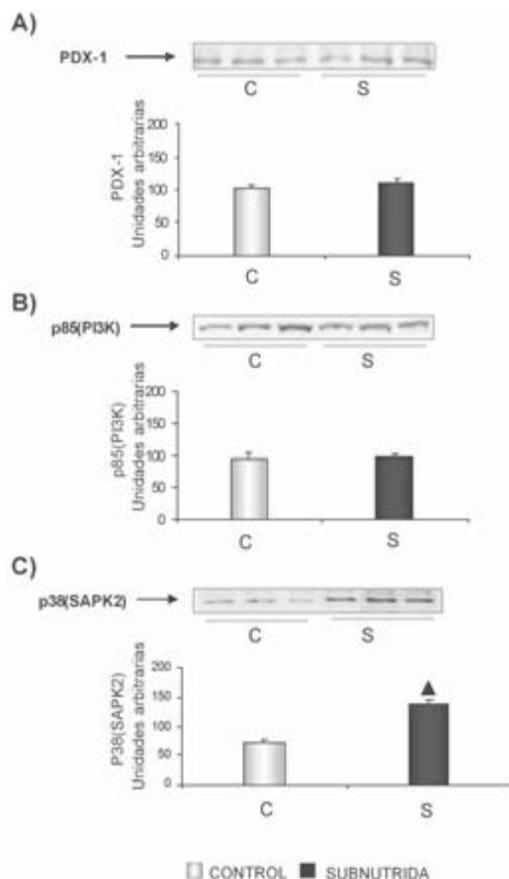


FIGURA 3. **Contenido proteico de PDX-1 (A), de la subunidad p85 de la PI3K (B) y de la p38/SAPK2 (C) en islotes aislados de fetos a término, controles (C) y subnutridos (S).** Las imágenes muestran una autorradiografía representativa de seis experimentos realizados donde cada banda contiene 50 μ g de extracto de proteína de los islotes aislados. Los datos se expresan como unidades arbitrarias de la media \pm E.S. [▲] $p < 0,05$ relativo a ratas controles.

Niveles séricos de los IGFs

El IGF-1 en suero fue valorado por enzimoimmunoanálisis, encontrándose una disminución significativa de sus niveles en los fetos a término procedentes de madres subnutridas en relación a los datos

de la población control. Sin embargo, la valoración por el método del radioreceptor de los niveles séricos de IGF-2 no reveló diferencia alguna entre ambos grupos (Figura 4A).

Expresión génica de IGF-1/2 en hígado y páncreas

Aunque el hígado es la principal fuente de producción de los IGFs, estos también se expresan en el páncreas endocrino fetal.

Las medidas densitométricas obtenidas a partir de la realización del ensayo de protección de la ribonucleasa revelaron que la expresión en hígado del mRNA de IGF-1 se encontraba significativamente disminuida en los fetos procedentes de madres subnutridas en comparación con el grupo control, mientras que la expresión hepática del IGF-2 fue similar entre ambas poblaciones (Figura 4B).

En la Figura 4C se observa que los niveles pancreáticos del mRNA de IGF-1 en fetos subnutridos eran significativamente superiores a los encontrados en el grupo control. Por otro lado, la expresión hepática de IGF-2 aparecía significativamente reducida.

Respuesta mitogénica a los IGFs en islotes aislados de fetos: estudio inmunohistoquímico

Al adicionar al medio de cultivo IGF-1/2 se indujo un aumento significativo de la replicación de las células β tanto en el grupo control como en el subnutrido en relación a los valores basales obtenidos en ausencia de IGFs (de $0,972 \pm 0,11$ en ausencia de IGFs a $1,61 \pm 0,1$ con IGF-1 ó $1,67 \pm 0,12$ con IGF-2 en el caso del grupo control; de $1,21 \pm 0,13$ en ausencia de IGFs a $2,68 \pm 0,14$ con IGF-1 ó $3 \pm 0,22$ con IGF-2 para el grupo subnutrido). No se halló diferencia alguna entre el efecto mitogénico de IGF-1 y de IGF-2. Sin embargo, la respuesta mitogénica a los IGFs en la población subnutrida fue significativamente superior a la encontrada en el grupo control posiblemente debido al mayor contenido de IGF-1R que presentan sus islotes fetales.

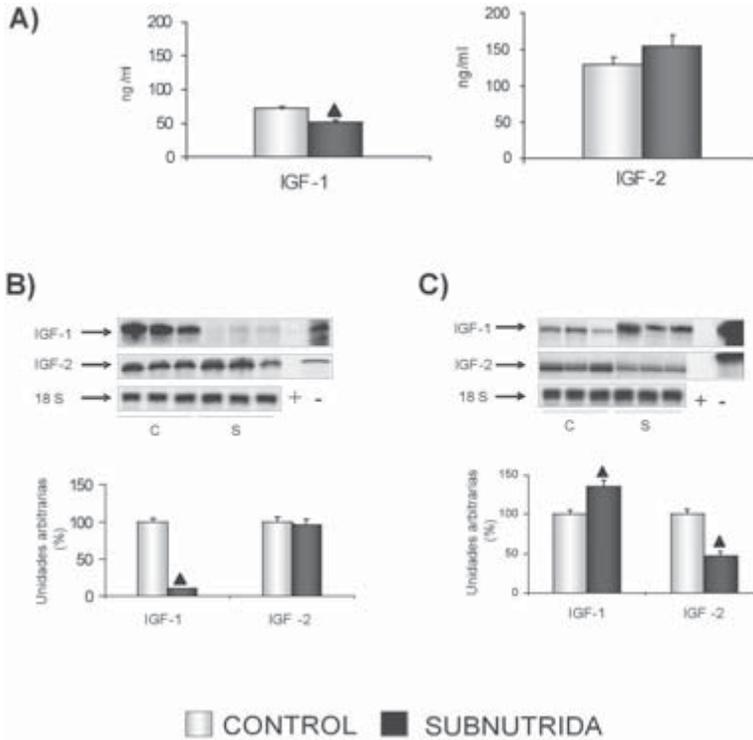


FIGURA 4. **(A)** Concentración en suero de IGF-1 y -2 en fetos de 21,5 días de gestación controles y subnutridos. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de 11-12 observaciones diferentes dentro de cada grupo. Los fetos fueron obtenidos de entre 5-7 camadas distintas. Ensayo de protección de la ribonucleasa de los transcritos hepáticos **(B)** y pancreáticos **(C)** de IGF-1 y -2 en fetos controles (c) y subnutridos (s) de 21,5 días de gestación. Los controles + y - se obtuvieron por tratamiento de la ribosonda con o sin RNasas respectivamente. Las autorradiografías que se muestran son representativas de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de 8-9 observaciones distintas dentro de cada grupo. Los fetos fueron obtenidos de entre 4-6 camadas diferentes. ▲*p* < 0,05 relativo a ratas controles.

Hay que señalar que el número de células β por islote aislado fue similar entre los fetos subnutridos y los controles (361 ± 39 , $n = 15$ vs. 335 ± 24 , $n = 14$).

Efecto mitogénico inducido por la glucosa y el IGF-1 sobre los islotes aislados de fetos: estudio por enzimoanálisis

Una vez visto que tanto la expresión pancreática del IGF-1 como el metabolismo oxidativo de la glucosa estaban incrementados en los fetos subnutridos, y dado que ambos son capaces de estimular el crecimiento de las células β durante el periodo fetal de un modo sinérgico, quisimos estudiar el efecto mitogénico de estos factores en islotes fetales controles y subnutridos.

El aumento de la concentración de glucosa de 3 a 17 mM incrementó en las dos poblaciones el índice de proliferación, siendo este aumento todavía mayor cuando se añadió IGF-1 al medio. Sin embargo, el efecto mitogénico producido por el IGF-1, a las dos concentraciones de glucosa utilizadas, fue significativamente más elevado en los islotes subnutridos en comparación con la respuesta encontrada en sus correspondientes controles (Figura 5).

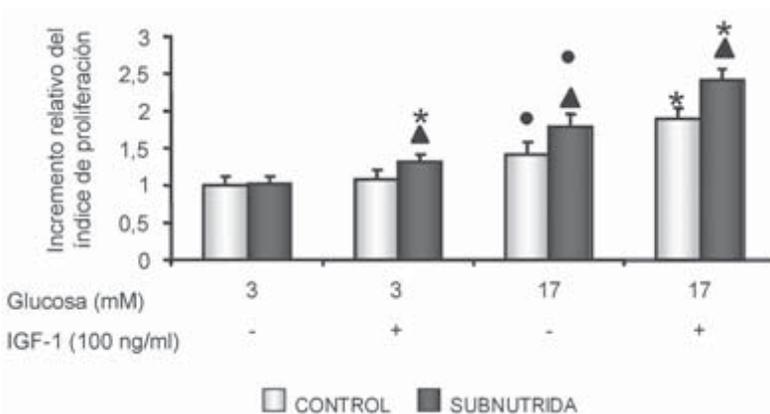


FIGURA 5. **Índice de proliferación en islotes fetales aislados de ratas controles y subnutridas.** El índice de incorporación de BrdU fue determinado, para cada condición y experimento, sobre cinco pocillos diferentes y se realizaron cuatro experimentos independientes ($n = 20$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido dentro de cada población a 3 mM de glucosa. $\wedge p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles en la misma condición, $\bullet p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $* p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa en ausencia de IGF-1 dentro de cada población.

Niveles proteicos del receptor de IGF-1 y fosforilación del mismo

El efecto mitogénico del IGF-1 es mediado a través de la interacción con su receptor, el IGF-1R. Los islotes fetales, controles y subnutridos, tras dos días de cultivo se mantuvieron durante 20 horas más a 3 mM de glucosa y sin suero (periodo de quiescencia). A continuación, los islotes quiescentes bien se lisaron directamente o tras el periodo de estimulación con 3 ó 17 mM de glucosa \pm 100 ng/ml de IGF-1. Estas condiciones son comunes para todas las determinaciones.

Como se muestra en la Figura 6A, los niveles proteicos del IGF-1R encontrados en la población subnutrida fueron un 30% superiores a los datos obtenidos en el grupo control. La estimulación de los islotes fetales durante 5 minutos con IGF-1 indujo, en ambas poblaciones, un aumento significativo de la fosforilación en tirosina del receptor; si bien, este aumento fue significativamente superior en los fetos subnutridos (Figura 6B).

Contenido proteico de IRS-2 y su asociación con la subunidad reguladora p85 de la PI3K

Como la autofosforilación del IGF-1R y la activación de su actividad tirosina kinasa, conduce a la fosforilación en tirosina del IRS-2, quisimos saber si la subnutrición podía estar afectando el contenido proteico del IRS-2.

En la Figura 7A se puede apreciar que los niveles proteicos de IRS-2 en los islotes procedentes de fetos subnutridos eran el doble que los valores encontrados en la población control. Observamos también una mayor asociación, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con glucosa e IGF-1, de IRS-2 con la subunidad reguladora de la PI3K (Figura 7B).

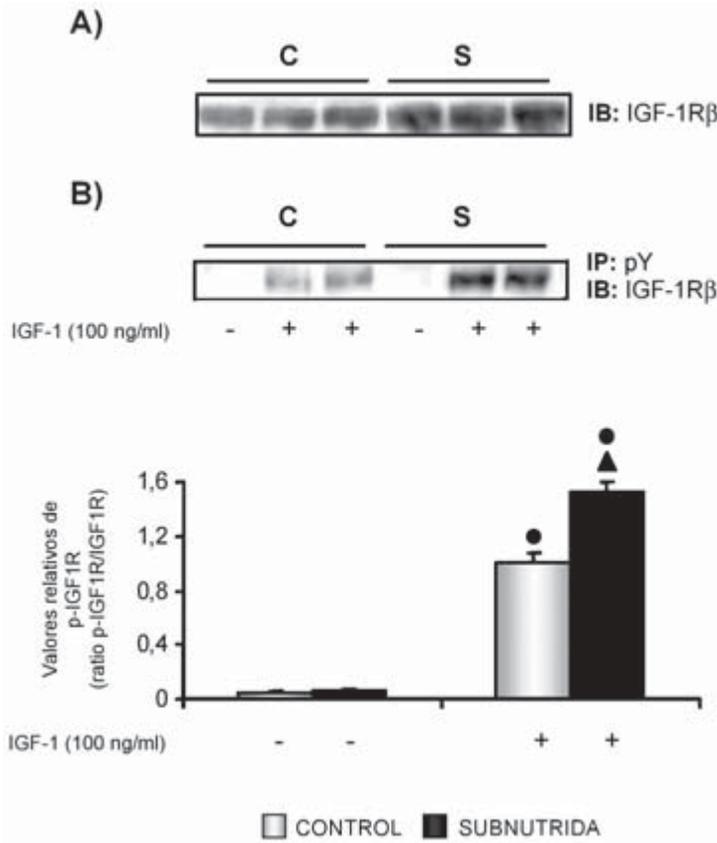


FIGURA 6. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico (A) y fosforilación (B) del IGF-1R. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de tres experimentos independientes. \blacktriangle $p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles de la misma condición, \bullet $p < 0,05$ relativo a islotes fetales de su misma población en ausencia de IGF-1.

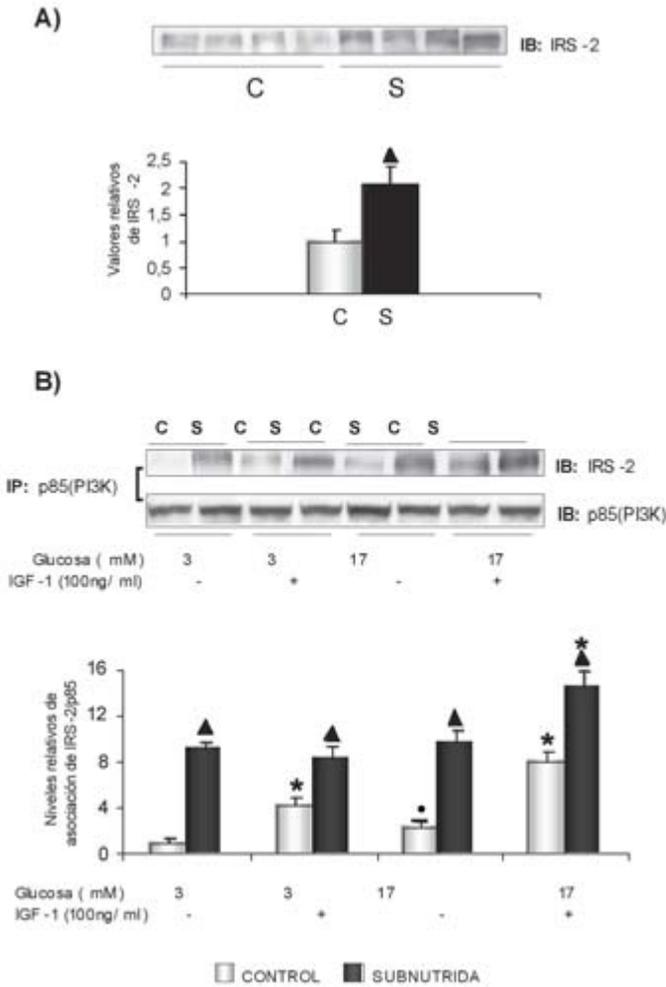


FIGURA 7. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico de IRS-2 (A) y su asociación con la subunidad reguladora p85 de la PI3K (B). Los datos de cuatro experimentos independientes se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. $\blacktriangle p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles de la misma condición, $*p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $*p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa en ausencia de IGF-1 dentro de cada población.

Contenido proteico y fosforilación de Akt, GSK3 y PKC ζ

El incremento en la asociación entre IRS-2/p85 conduce a un aumento en los niveles de fosforilación de Akt, la cual desempeña un papel fundamental no sólo en la proliferación de las células β , sino también en su supervivencia. Nosotros hemos encontrado en la población subnutrida que Akt está constitutivamente activa y que los niveles de fosforilación de la misma son considerablemente mayores que lo encontrado en el grupo control bajo todas las condiciones estudiadas (Figura 8A). Asimismo, se analizaron los niveles de fosforilación de diversas dianas de Akt. Respecto a GSK3, únicamente aparecieron incrementados (60%) en relación a los valores controles en situación basal (Figura 8B). Otra diana de la Akt, la isoforma atípica ζ de la proteína kinasa C (PKC ζ), también se encuentra constitutivamente activa en los islotes procedentes de fetos subnutridos puesto que en situación basal los niveles de fosforilación de ésta fueron cinco veces superiores a lo observado en los islotes de la población control (Figura 8C).

Contenido proteico y fosforilación de mTOR, p70S6K y 4EBP-1

Uno de los múltiples factores que determinan la masa de células β es el tamaño celular, el cual generalmente se relaciona con la síntesis de proteínas. En este sentido, cabe destacar el mTOR, cuya fosforilación-activación por parte de la Akt conduce a su vez, a la fosforilación de dos proteínas implicadas en el control de la traducción de proteínas, la p70S6K y la 4EBP-1. Como se muestra en la Figura 9A, en los islotes procedentes de fetos subnutridos mTOR se encontró ya activo en situación basal y durante todo el estudio los niveles de mTOR fosforilado fueron superiores en el grupo subnutrido en comparación con el control. Como cabría esperar, en el grupo subnutrido se encontró que la p70S6K estaba constitutivamente activada y, en presencia de IGF-1, tanto a una concentración basal como estimulante de glucosa, esta fosforilación fue significativamente superior a lo observado en el grupo control (Figura 9B). De modo similar, en situación basal los niveles de fosforilación de la 4EBP-1 también fueron significativamente más elevados en la población subnutrida en relación a lo encontrado en los islotes procedentes de fetos controles y permanecieron así durante todo el estudio (Figura 9C).

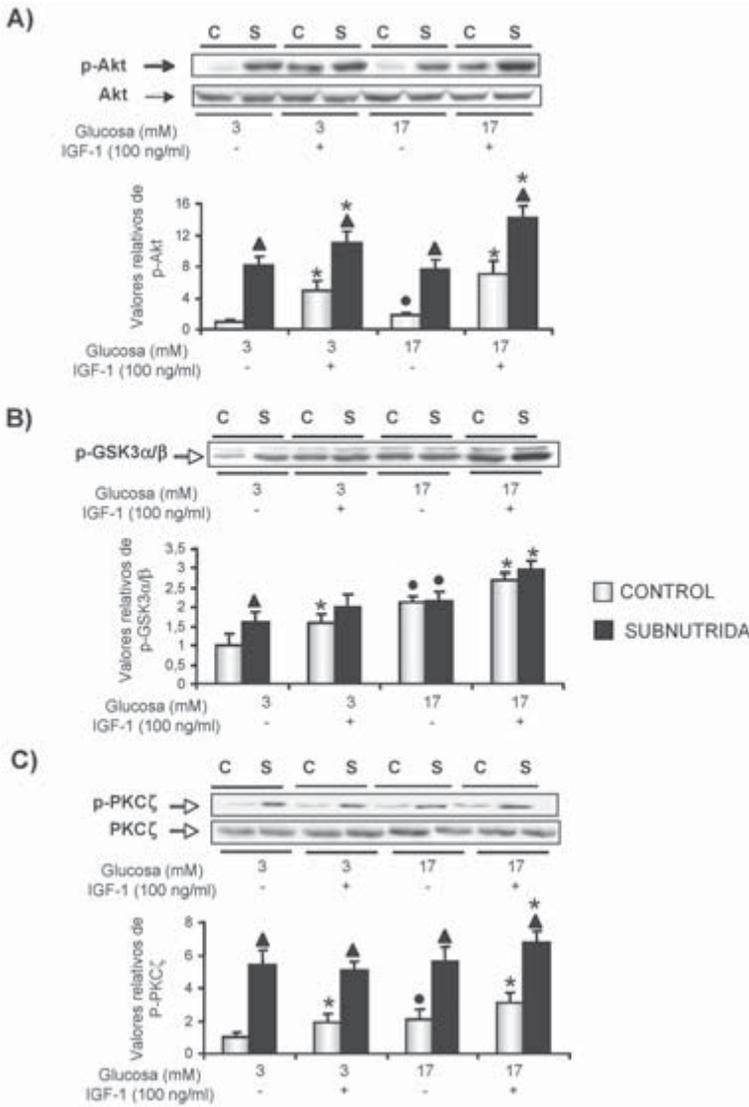


FIGURA 8. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de Akt (A), GSK3 (B) y PKCζ (C). Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Los datos se expresan como la media ± E.S. respecto al valor obtenido en la población C a 3 mM de glucosa. ▲p < 0,05 relativo a islotes fetales C de la misma condición, *p < 0,05 relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, *p < 0,05 relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

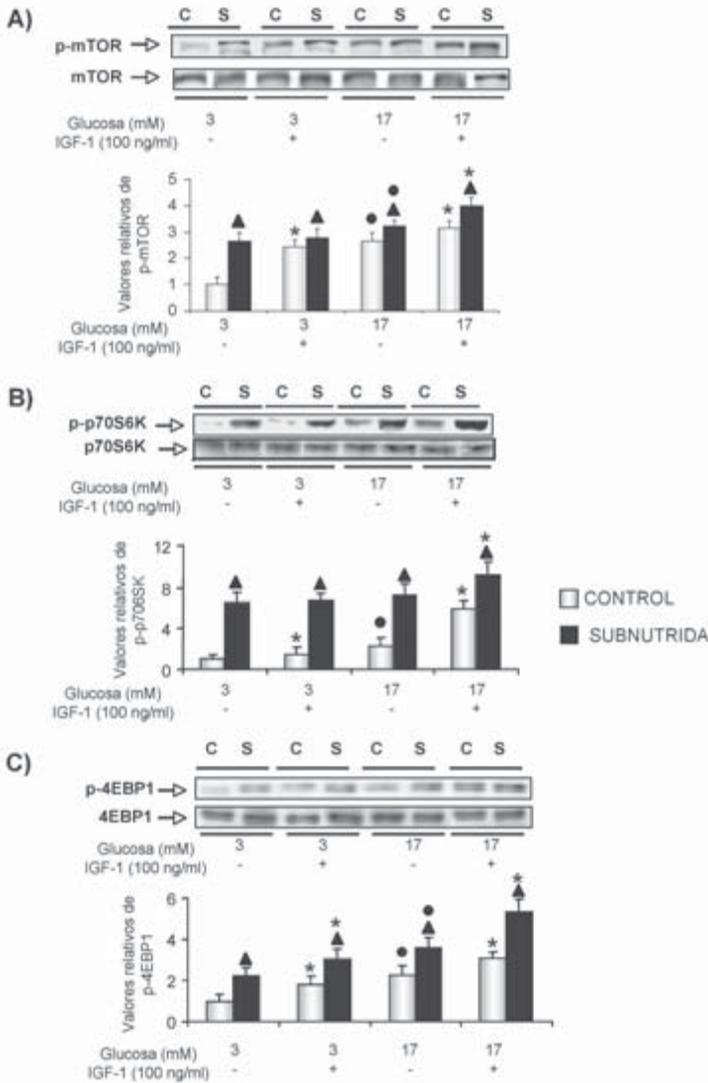


FIGURA 9. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de mTOR (A), p70S6K (B) y 4EBP-1 (C). Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. $\blacktriangle p < 0,05$ relativo a islotes fetales C de la misma condición, $\bullet p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $\ast p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

Contenido proteico y fosforilación de Erk-1/2 en islotes pancreáticos fetales

La glucosa puede también inducir la fosforilación-activación de Erk-1/2 en las células β , independientemente de IRS-2. La activación de la ruta de las MAPK es un requisito esencial en la estimulación del proceso mitogénico de las células β inducido por glucosa e IGF-1. Por este motivo decidimos estudiar cuál podría ser el efecto de la subnutrición en los pasos finales de esta vía.

Tanto en islotes controles como en subnutridos, el aumento de glucosa en el medio indujo un incremento significativo en la fosforilación de las Erks, siendo este aumento mayor en presencia de IGF-1. Pero al contrario de lo encontrado en la vía del IRS-2/Akt/P70S6K, parecía no existir efecto alguno de la malnutrición sobre la activación de las Erks por glucosa e IGF-1 (Figura 10).

DISCUSIÓN

Una reducción de la ingesta diaria de alimento del 65%, durante la tercera semana de gestación, provoca en las ratas gestantes un daño en la secreción *in vivo* de insulina, así como intolerancia a la glucosa (5). Además, la alteración de la homeostasis glucídica materna en este modelo, conduce a un incremento de la masa de células β y a hiperinsulinemia en los fetos a término. El presente estudio trata de determinar qué cambios metabólicos y moleculares podrían ser los responsables de las alteraciones observadas en la etapa fetal.

La hiperinsulinemia descrita en los fetos subnutridos viene acompañada de un incremento en el contenido de insulina por islote, así como de una mayor liberación de insulina estimulada por glucosa. Sin embargo, cuando el índice de secreción de insulina se normalizó en relación al contenido de insulina por islote, la fracción de insulina liberada fue similar a la encontrada en el grupo control. Estos resultados indican que el mecanismo secretor de las células β en los animales subnutridos no está dañado y a la vez son indicativos del papel regulador del contenido de insulina en la propia liberación de la hormona.

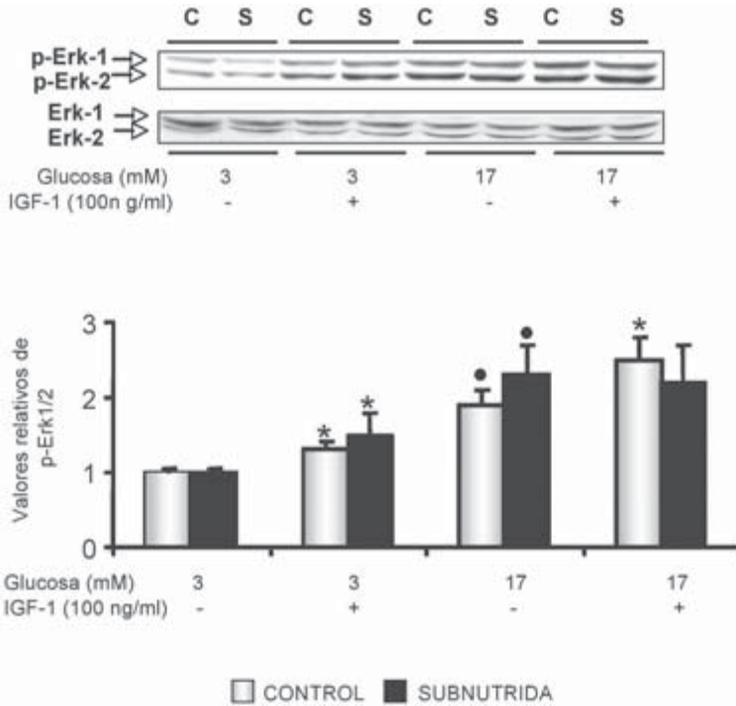


FIGURA 10. **Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de Erk-1/2.** Se muestra un experimento representativo de cinco realizados. Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. * $p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, * $p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

Para determinar si las alteraciones observadas en el contenido de insulina podrían ser causadas por cambios en la expresión del gen de insulina, nos propusimos valorar los niveles del mRNA de insulina en el páncreas de los animales controles y subnutridos. En línea con las observaciones anteriores encontramos que éste estaba incrementado en los fetos subnutridos en comparación con el correspondiente grupo control. Estos elevados niveles del mRNA de insulina podrían ser el resultado de un incremento en los requisitos de insulina, como consecuencia de episodios hiperglucémicos postprandiales generados por la alteración de la homeostasis glucídica presente en las ratas gestantes (5).

El principal estímulo fisiológico para la síntesis de insulina es la glucosa. Dado que la glucosa regula la producción de insulina por medio de señales procedentes de la ruta glucolítica, nos planteamos valorar en islotes fetales si se había producido alguna adaptación del metabolismo de la glucosa en el interior de la células β como consecuencia de la subnutrición. La medida del flujo glucolítico total no puso de manifiesto ninguna perturbación de la concentración de glucosa intracelular, lo cual indicaba que la captación de glucosa por las células β no estaba dañada (datos no mostrados). Sin embargo, y en línea con los resultados mostrados de expresión y contenido de insulina, los islotes procedentes de fetos subnutridos expuestos a una concentración estimulante de glucosa (16,7 mM), incrementaron significativamente la oxidación de glucosa en el ciclo de Krebs con respecto a los valores controles. Estos resultados sugieren que las alteraciones encontradas en la expresión del gen de insulina podrían estar relacionadas, al menos en parte, con cambios en la oxidación mitocondrial de glucosa.

Los resultados concernientes a las alteraciones encontradas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que parecen conducir a cambios en la síntesis de insulina pero no en el mecanismo secretor, revelan que, aunque la síntesis y secreción de insulina estimuladas por glucosa comparten determinados pasos de la misma cascada de señales, ambos procesos deben, necesariamente, divergir en algún punto. Recientemente se ha visto que este punto de divergencia parece hallarse en algún paso de la anaplerosis, por debajo de la glucólisis y por encima de la fosforilación oxidativa (27). La naturaleza de las señales procedentes del metabolismo de la glucosa que conectan con la expresión y síntesis de insulina no están todavía totalmente establecidas, pero nuestros resultados parecen situar estas señales en el ciclo de Krebs, de acuerdo con otros autores (27, 28).

La transcripción del gen de insulina viene determinada por la interacción entre diversos elementos reguladores y factores de transcripción, entre los que cabe destacar el PDX-1 como uno de los principales mediadores del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen de insulina (9). Aunque los niveles proteicos de PDX-1 en islotes de fetos subnutridos fueron similares a los del grupo control, los niveles de la p38/SAPK2, proteína implicada en la activación de PDX-1 (10), se encontraron significativamente elevados. SAPK2 es

un miembro de la extensa familia de proteínas kinasas activadas por mitogénos que se caracteriza por activarse en respuesta a estímulos adversos (10). El incremento detectado en los niveles de p38/SAPK2 sugiere que la restricción nutricional en los fetos podría suponer una situación de estrés y, que como tal, indujese en los islotes la respuesta correspondiente. Resultados similares se han descrito en islotes procedentes de ratas neonatales sometidas a una dieta rica en carbohidratos, en los que el incremento detectado en los niveles del mRNA de insulina y en la actividad de SAPK2 se relacionó con una situación de estrés provocada por el tratamiento nutricional (29). Por otro lado, se ha encontrado que la sobreexpresión de SAPK2 parece mimetizar los efectos de la glucosa resultando en una hiperestimulación de la ruta de activación de PDX-1 (11). Además del estrés, el metabolismo de la glucosa es capaz de activar p38/SAPK2 a través de una cascada de señales que implica la participación de PI3K (10, 11). Aunque no se detectaron variaciones en los niveles de PI3K de los animales subnutridos, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento descrito en el metabolismo oxidativo de los fetos subnutridos pudiera estar causando una mayor activación de PI3K y, en consecuencia, de p38/SAPK2. Por tanto, teniendo en cuenta que la activación de PDX-1 parece estar regulada por algún metabolito(s) derivado de la glucosa, las alteraciones causadas en el metabolismo oxidativo de la glucosa por la subnutrición, podrían estar, de algún modo, afectando la expresión del mRNA de insulina.

Por otro lado, como en nuestro modelo de malnutrición global los fetos a término presentan un incremento en la masa de células β , quisimos saber si la subnutrición estaba alterando la disponibilidad de factores de crecimiento, tales como los IGFs y, en qué grado, esta disponibilidad podría estar determinando el aumento de la masa de células β observado.

La mayoría de los estudios sobre la regulación nutricional del IGF-1 se han realizado en el hígado y en todos estos estudios, además de en aquellos pocos en los que se han investigado otros tejidos, se ha observado que la subnutrición disminuye la expresión génica y proteica del IGF-1 durante el periodo neonatal y adulto (17), así como durante la etapa fetal (25, 30). En concordancia con estas investigaciones, los fetos subnutridos presentan reducidos niveles hepáticos del mRNA de IGF-1 y, probablemente, consecuencia de

esto sean los bajos niveles séricos de IGF-1 observados. De hecho, existen antecedentes de una reducción de los niveles circulantes de IGF-1 en situaciones de restricción nutricional (25, 30, 31). Por el contrario, y en línea con estudios previos (25, 31), no hemos detectado variación alguna en los niveles séricos y hepáticos de IGF-2 como consecuencia de la malnutrición global. Estos datos parecen indicar, como ya se había descrito anteriormente (15), que el IGF-1 es más sensible que el IGF-2 a cambios de la dieta materna, independientemente de la causa o naturaleza del déficit nutricional.

Se sabe que durante la vida fetal y principios de la postnatal, las acciones del IGF-1 son fundamentalmente locales, de modo que los IGFs producidos por el páncreas actuarían de forma autocrina/paracrina y estarían implicados en la regulación del crecimiento y diferenciación de los islotes (14). En este sentido, parece lógico pensar que el incremento encontrado en los niveles pancreáticos del mRNA de IGF-1 en fetos procedentes de madres subnutridas podría estar desempeñando un importante papel en el aumento de su masa de células β . De acuerdo con nuestras observaciones, en otro modelo de malnutrición (32) se ha descrito una elevada expresión génica de IGF-1 en cerebro de ratón, lo cual ha sido relacionado con un efecto protector de este órgano frente a la carencia de nutrientes. En este sentido, la expresión local de IGF-1, protegería el páncreas endocrino de los fetos del impacto de la subnutrición materna, en un periodo crítico para el desarrollo del páncreas. Además, dado que la insulina es un importante regulador del crecimiento, de la función y de la supervivencia de las células β (14), la hiperinsulinemia que presentan los fetos subnutridos podría estar también contribuyendo a elevar la masa de células β , es decir, el IGF-1 y la insulina podrían estar actuando cooperativamente.

Por otro lado, la producción pancreática de IGF-2 aparece significativamente reducida en los fetos subnutridos. Esto está en concordancia con las observaciones descritas en fetos procedentes de madres sometidas a restricción proteica (33). Sin embargo, en estos estudios, la baja expresión pancreática de IGF-2 se correlaciona con una masa de células β reducida, mientras que en el presente trabajo no se observa este patrón. Parece ser que bajo nuestras condiciones de estudio, la influencia de la malnutrición materna sobre el sistema de IGFs es específica de tejido.

Cuando, se analizó *in vitro* la respuesta mitogénica de las células β a los IGFs se observó que tanto IGF-1 como -2, inducían la proliferación de las células β . Ahora bien, esta respuesta fue significativamente superior en la población subnutrida, posiblemente como consecuencia del mayor contenido en islote de receptores de IGF-1. Aunque el IGF-1 es más mitógeno que el IGF-2, no se observaron diferencias en el índice de proliferación inducido por estos factores, ni en la población control ni en la subnutrida, debido, seguramente, a que ambos factores actúan a través del mismo receptor, el IGF-1R.

A la vista de estos resultados, el siguiente objetivo que nos planteamos fue caracterizar el sistema de transducción de señales de la glucosa e IGF-1 que podrían estar implicadas en la mayor masa de células β encontrada en los fetos subnutridos. Con este fin, hemos desarrollado un modelo *in vitro* de islotes fetales primarios que fueron cultivados 48 horas con 11 mM de glucosa. Posteriormente, estos islotes se mantuvieron 20 horas más en un medio libre de suero con 3 mM de glucosa (periodo de quiescencia). Este procedimiento experimental nos permitió obtener mejores condiciones fisiológicas y minimizar los posibles efectos que sobre la ruta de señales del IGF-1 podría tener la glucosa y el suero tras un prolongado periodo de cultivo.

En primer lugar encontramos que la glucosa era capaz de estimular la replicación de las células β en islotes fetales cultivados dos días, si bien esta respuesta aparecía significativamente elevada en el grupo subnutrido. La adición al medio de IGF-1 en los cultivos de islotes controles tan sólo indujo una mayor replicación a 17 mM de glucosa, lo cual no es sorprendente, puesto que el IGF-1 sólo provoca una respuesta mitogénica en presencia de un rango fisiológico de concentraciones de glucosa de entre 6 a 18 mM (18). Sin embargo, en los islotes subnutridos, incluso a 3 mM de glucosa, se detectó un incremento en el índice mitótico en respuesta al estímulo de IGF-1. Estos resultados sugieren que los islotes fetales subnutridos presentan una mayor sensibilidad a glucosa y a IGF-1 que el grupo control.

Para identificar el mecanismo subyacente a la mayor respuesta replicativa encontrada en la población subnutrida valoramos, tanto en islotes fetales controles como subnutridos, los niveles de diferentes proteínas implicadas en la vía mitogénica del IGF-1 y su fosforilación después de estimular con IGF-1 y glucosa. Para que el IGF-1 desem-

peñe su acción sobre el crecimiento celular, es necesario que interactúe con su receptor presente en las células β (18). Como consecuencia, el incremento encontrado en los islotes fetales subnutridos, en cuanto al contenido y fosforilación del IGF-1R, podría estar favoreciendo la acción mitogénica del IGF-1. Asimismo, la activación del IGF-1R conduce a la fosforilación en tirosina y consecuente activación del IRS-2, el cual está implicado de modo trascendental en el crecimiento de las células β . Así, por ejemplo, se ha visto que la sobreexpresión de IRS-2 promueve la replicación de células β , la neogénesis y la supervivencia (34). En este sentido, nosotros hemos encontrado un incremento significativo de los niveles de IRS-2 en los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas, además de una mayor asociación, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con glucosa e IGF-1, de IRS-2 con la subunidad reguladora de la PI3K. Parece ser, que cuando se produce un aumento en la expresión de IRS-2, esta proteína se dirige hacia la membrana plasmática de las células β favoreciéndose entonces su fosforilación basal en tirosina y, por tanto, incrementando la activación de la señalización a través de IRS-2/PI3K/Akt tanto en situación basal como en respuesta a glucosa e IGF-1 (35). En relación con esto, la mayor activación observada, en los islotes subnutridos, de la cascada de señales de la PI3K podría ser consecuencia de los elevados niveles de IRS-2. Esta respuesta se correlaciona además, con el incremento descrito en la replicación, inducida por glucosa e IGF-1, de las células β en los islotes de fetos subnutridos, lo que reafirma el importante papel del IRS-2 en la proliferación de las células β . Es interesante señalar que la glucosa, a través de su metabolismo oxidativo, es capaz de aumentar específicamente el nivel de expresión endógena de IRS-2 (36). En relación con esto y teniendo en cuenta que los islotes de fetos subnutridos presentan una elevada oxidación mitocondrial de glucosa, sugerimos que este elevado metabolismo oxidativo podría estar relacionado con el incremento detectado en el contenido de IRS-2 de estos islotes.

Asimismo, es importante mencionar que la activación de Akt, kinasa situada por debajo de IRS-2, desempeña un papel fundamental en la supervivencia de las células β (37). Además, la glucosa por sí misma puede promover la supervivencia de las células β a través de la activación de la vía de señales PI3K/Akt. De este modo, se podría considerar que el hecho de que la Akt esté activada incluso

en situación basal conduce, en los fetos sometidos a restricción nutricional, a un incremento de la supervivencia y proliferación de las células β .

Para determinar el papel de la Akt en la respuesta mitogénica observada en los islotes de fetos subnutridos, evaluamos las dianas de la Akt que podrían estar implicadas en este proceso. Se ha descrito que la Akt puede activar una de las isoformas atípicas de la proteína kinasa C, la PKC ζ , la cual potencia la mitogénesis de las células β en respuesta al péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) (38). En este estudio, nosotros hemos encontrado que el incremento en la fosforilación de PKC ζ en la población subnutrida se correlaciona con el incremento en la fosforilación de Akt lo que sugiere una implicación de la PKC ζ en el aumento de la respuesta replicativa de los islotes subnutridos tras la estimulación con glucosa e IGF-1. A diferencia de la PKC ζ , el incremento en la fosforilación de la Akt en los islotes de fetos subnutridos, únicamente indujo mayor inhibición de GSK3 en situación basal, pero no en respuesta a IGF-1 y/o glucosa. Por lo tanto, podemos suponer que GSK3 no está implicada en la mayor replicación de las células β encontrada en el grupo subnutrido pero podría estar promoviendo procesos de supervivencia celular (39).

Por debajo de Akt, mTOR integra señales derivadas de factores de crecimiento y de nutrientes. Esta serina/treonina kinasa regula el crecimiento celular a través, de al menos, dos proteínas, la 4E-BP1 y la p70S6K, cuya activación conduce al aumento de la síntesis de proteínas en las células β . Nosotros hemos encontrado en este estudio que los niveles de fosforilación de mTOR estaban significativamente elevados en los islotes de fetos subnutridos en comparación con los valores controles, incluso en condiciones basales. Además, los mayores niveles de fosforilación de mTOR hallados en los islotes subnutridos se correlacionan con un incremento proporcional de la fosforilación de p70S6K y de 4E-BP1. Esta respuesta aumentada de mTOR parece deberse a la capacidad de la glucosa de activar esta proteína en las células β independientemente de IRS-2/Akt (40). Por lo tanto, es lógico pensar que el incremento descrito en el metabolismo oxidativo de la glucosa de los fetos subnutridos, podría estar contribuyendo a aumentar la fosforilación de mTOR y, en consecuencia, la replicación de las células β . Estos resultados ponen de manifiesto la importancia y necesidad de una óptima función mito-

condrial para la adecuada regulación del crecimiento y proliferación de las células β .

Es sorprendente que la respuesta replicativa de las células β de los islotes subnutridos no esté aumentada a 3 mM de glucosa en relación al grupo control, cuando, en condiciones basales, hemos encontrado que la fosforilación de Akt, PKC ζ , GSK3, 4E-BP1 y p70S6K sí estaba significativamente elevada. Sin embargo, basándonos en la literatura se sabe que para que se produzca la mitogénesis de las células β es necesaria no sólo la participación de Akt, si no también la de las Erk-1/2 y, en condiciones basales, esta última vía no se vio afectada. De hecho, el incremento observado en los islotes procedentes de fetos subnutridos en los niveles de IRS-2 tampoco tuvo efecto alguno sobre la activación, inducida por glucosa e IGF-1, de Erk-1/2, a pesar de que la proteína IRS-2 es común a las dos vías. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en células INS-1 (36). Aunque el metabolismo de la glucosa también media la activación de las Erks, la cascada de señales que provoca dicha activación es distinta de la implicada en la estimulación de mTOR (40). Así, al contrario de lo que ocurría con mTOR, no hemos encontrado diferencia alguna en los niveles de fosforilación de las Erks entre los grupos control y subnutrido.

Nuestros resultados demuestran que los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas presentan múltiples alteraciones en la ruta de señalización del IGF-1, lo que provoca una mayor activación de la vía del IRS-2/PI3K/Akt/mTOR y una respuesta mitogénica a glucosa e IGF-1 más potente. Todos estos cambios moleculares pueden estar contribuyendo al aumento de la masa de células β encontrado en los fetos subnutridos. Asimismo, y dado que el IRS-2 desempeña un importante papel promoviendo la supervivencia (36) y la neogénesis de las células β (34), el hecho de estar aumentado su contenido en los islotes subnutridos sugiere que ambos procesos podrían estar implicados en el incremento de la masa de células β descrito en esta población (Figura 11).

En conclusión, nuestro modelo animal de subnutrición intrauterina y crónica, es una herramienta muy útil para analizar, *in vivo* e *in vitro*, los efectos que distintos factores puedan tener sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células β . La compren-

sión de las señales moleculares implicadas en el crecimiento de dichas células, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, podría permitir poner en marcha futuras estrategias dirigidas a la prevención y tratamiento de la diabetes y de otros desórdenes metabólicos relacionados.

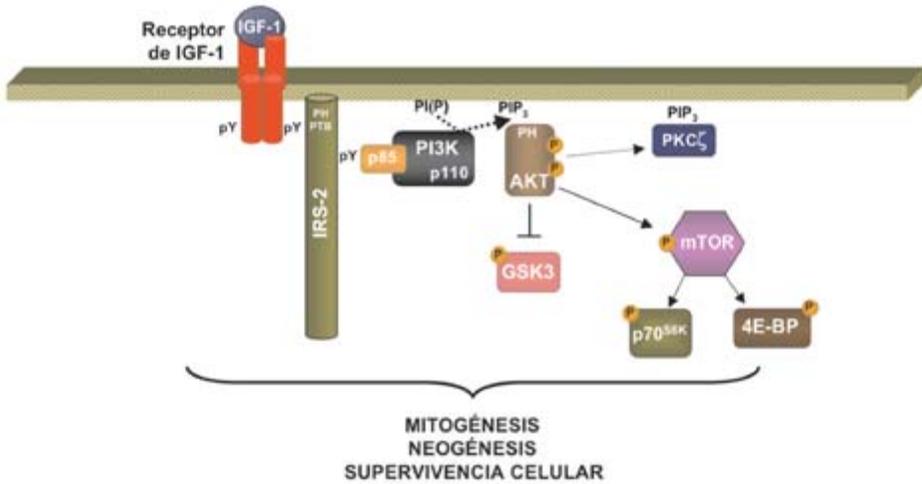


FIGURA 11. **Hiperactivación de la ruta de señalización del IRS-2/PI3K/Akt/mTOR** implicada en el incremento encontrado en la masa de células β de los fetos subnutridos.

AGRADECIMIENTOS

Elisa Fernández Millán es contratada Doctor del ISCIII-RETIC RD06.

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto BFU2005-02849 (MEC) y por el ISCIII-RETIC RD06.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HALES, C. N. and BARKER, D. J. P. (1992): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 35: 595-601.

- (2) DAHRI, S.; SNOECK, A.; REUSENS-BILLEN, B.; REMACLE, C. and HOET, J. J. (1991): Islet function in offspring of mothers on low protein-diet during gestation. *Diabetes*. 40: 115-120.
- (3) BERTIN, E.; GANGNERAU, M. N.; BELLON, G.; BAILBE, D.; ARBELOT DE VACQUEUR, A. and PORTHA, B. (2002): Development of beta cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R623-R630.
- (4) GAROFANO, A.; CZERNICHOV, P. and BREANT, B. (1998): Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia*. 41: 1114-1120.
- (5) ÁLVAREZ, C.; MARTÍN, M. A.; GOYA, L.; BERTIN, E.; PORTHA, B. and PASCUAL-LEONE, A. M. (1997): Contrasted impact of maternal rat food restriction on the fetal endocrine pancreas. *Endocrinology*. 138: 2267-2273.
- (6) OLIVER, M. H.; HAWKINS, P.; BREIER, B. H.; VAN ZIJL, P. L.; SARGISON, S. A. and HARDING, J. E. (2001): Maternal undernutrition during the periconceptual period increases plasma taurine levels and insulin response to glucose but not to arginine in the late gestation fetal sheep. *Endocrinology*. 142: 4576-4579.
- (7) AERTS, L.; HOLEMANS, K. and VAN ASSCHE, F. A. (1990): Maternal diabetes during pregnancy: Consequence for the offspring. *Diab. Metab. Rev.* 6: 147-167.
- (8) MARTÍN, M. A.; ÁLVAREZ, C.; GOYA, L.; PORTHA, B. and PASCUAL-LEONE, A. M. (1997): Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am. J. Physiol.* 272: E634-E640.
- (9) MACFARLANE, W.; READ, M.; GILLIGAN, M.; BUJALSKA, I. and DOCHERTY, K. (1994): Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem. J.* 303: 625-631.
- (10) MACFARLANE, W. M.; SMITH, S. B.; JAMES, R. F. L.; CLIFTON, A. D.; DOZA, Y. N.; COHEN, P. and DOCHERTY, K. (1997): The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by glucose in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 272: 20936-20944.
- (11) MCKINNON, C. M. and DOCHERTY, K. (2001): Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*. 44: 1203-1214.
- (12) BERNARD-KARGAR, C. and KTORZA, A. (2001): Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes*. 50: 30-35.
- (13) JONES, J. I. and CLEMMONS, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*. 16: 3-34.
- (14) HILL, D. J.; PETRIK, J. and ARANY, E. (1998): Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care Supplement*. 2: B60-B69.
- (15) FOWDEN, A. L. (2003): The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*. 24: 803-812.
- (16) HILL, D. J.; STRUTT, B.; ARANY, E.; ZAINA, S.; CONKELL, S. and GRAHAM, C. F. (2000): Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in

- neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology*. 141: 1151-1157.
- (17) THISSEN, J. P.; KETESLEGERS, J. M. and UNDERWOOD, L. M. (1994): Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15: 80-101.
 - (18) HUGL, S. R.; WHITE, M. F. and RHODES, C. J. (1998): Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic b-cell growth is glucose dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-1 in INS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 273: 17771-17779.
 - (19) HELLERSTRÖM, C.; LEWIS, N. J.; BORG, H.; JOHNSON, R. and FREINKEL N. (1979): Method for large-scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. *Diabetes*. 28: 769-776.
 - (20) MALAISSE, W. J. and SENER, A. (1988): Hexose metabolism in pancreatic islets. Feedback control of D-glucose oxidation by functional events. *Biochem. Biophys. Acta*. 971: 246-254.
 - (21) BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
 - (22) CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
 - (23) VALVERDE, A. M.; NAVARRO, P.; TERUEL, T.; CONEJO, R.; BENITO, M. and LORENZO M. (1999): Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT-4 gene expression in fetal brown adipocytes in a phosphoinositide 3-kinase dependent manner. *Biochem. J.* 337: 397-405.
 - (24) AMASINO, R. M. (1986): Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 152: 304-307.
 - (25) STRAUSS, D. S.; OOI, G. T.; ORLOWSKI, C. C. and RECHLER, M. N. (1991): Expression of the genes of insulin-like growth factor-I (IGF-I)-IGF-II and IGF binding proteins-I and -II in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology*. 128: 518-525.
 - (26) HUNTER, W. M. and GREENWOOD, F. C. (1962): Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 194: 495-496.
 - (27) ALARCÓN, C.; WICKSTEED, B.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. and RHODES, C. J. (2002): Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. *Diabetes*. 51: 2496:2504.
 - (28) LEIBOWITZ, G.; KHALDI, M. Z.; SHAUER, A.; PARNES, M.; OPRESCU, A. I.; CERASI, E.; JONAS, J. C. and KAISER, N. (2005): Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets. *Diabetología*. 48: 1549-1559.
 - (29) SRINIVASAN, M.; SONG, F.; AALINKEL, R. and PATEL, M. S. (2001): Molecular adaptations in islets from neonatal rats reared artificially on a high carbohydrate milk formula. *J. Nutr. Biochem.* 12: 575-584.
 - (30) EL-KHATTABI, I.; GREGOIRE, F.; REMACLE, C. and REUSENS, B. (2003): Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGFBPs and hepatocytes proliferation in fetal rats. *Am. J. Physiol.* 285: E991-E1000.

- (31) MUAKU, S. M.; BEAULOYLE, V.; THISSER, J.-P.; UNDERWOOD, L. E.; KELESLEPERS, J.-M. and MAITER, D. (1995): Effects of maternal protein malnutrition on fetal growth, plasma insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding protein and liver insulin-like growth factor gene expression in the rat. *Pediatr. Res.* 37: 334-342.
- (32) CALIKOGLU, A.; KARAYAL, A. and D'ERCOLE, A. (2001): Nutritional regulation of IGF-1 expression during brain development in mice. *Pediatr. Res.* 49: 197-202.
- (33) PETRIK, J.; REUSENS, B.; ARANY, E.; REMACLE, C.; COELHO, C.; HOET, J. J. and HILL, D. J. (1999): A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor II. *Endocrinology.* 140: 4861-4873.
- (34) HENNIGE, A. M.; BURKS, D. J.; OZCAN, U.; KULKARNI, R. N.; YE, J.; PARK, S.; SCHUBERT, M.; FISCHER, T. L.; DOW, M. A.; LESHAN, R.; ZAKARIA, M.; MOSSA-BASHA, M. and WHITE, M. F. (2003): Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest.* 112: 1521-1532.
- (35) LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E.; MCCUAIG, J. F.; MYERS, M. G. and RHODES, C. J. (2003): IRS-3 inhibits IRS-2-mediated signalling in pancreatic β -cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204: 85-99.
- (36) LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E.; BRIAUD, I.; MCCUAIG, J. F.; MYERS, M. G. and RHODES, C. J. (2003): Decreasing IRS-2 expression in pancreatic b-cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 209: 17-31.
- (37) TUTTLE, R. L.; GRILL, N. S.; PUGH, W.; LEE, J. P.; KOEBERLEIN, B.; FURTH, E. E.; POLONSKY, K. S.; NAJI, A. and BIRNBAUM, M. J. (2001): Regulation of pancreatic β -cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt/PKB α . *Nat. Med.* 7: 1133-1137.
- (38) BUTEAU, J.; FOISY, S.; RHODES, C. J.; CARPENTER, L.; BIDEN, T. J. and PRENTKI, M. (2001): Protein kinase C ζ activation mediates glucagons-like peptide-1-induced pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes.* 50: 2237-2243.
- (39) CHANG, F.; LEE, J. T.; NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S.; SHELTON, J. G.; BLALOCK, W. L.; FRANKLYN, R. A. and MCCUBREY, J. A. (2003): Involvement of PI3K/Akt in cell cycle progression, apoptosis and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 17: 590-603.
- (40) BRIAUD, I.; LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E. and RHODES, C. J. (2003): Differential activation mechanism of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 52: 974-983.

————— *Artículo original* —————

Aplicación en QSPR del parámetro topográfico V_{c3} a sustancias derivadas de la benceno sulfonamida

Recibido el 9 de febrero de 2007

E. CORNWELL *

*Departamento de Química Inorgánica y Analítica.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile*

RESUMEN

Un nuevo parámetro topográfico (V_{c3}) aplicado a la disciplina QSPR se utiliza para la reducción del número de variables independientes a una sola variable denominada V_{c3} . La reducción está basada en la relación de las distancias Euclidianas. Este procedimiento fue aplicado a un modelo de 19 sustancias derivadas del benceno sulfonamida utilizando el benceno sulfonamida como sustancia referente. Estas sustancias fueron caracterizadas por un grupo de propiedades fisicoquímicas en la forma de variables independientes, las variables utilizadas fueron: el índice de refracción, la tensión superficial y una variable auxiliar indicadora de la presencia o ausencia de átomos de cloro en la molécula bajo estudio, se utilizó como variable dependiente la constante de disociación pKa obteniéndose un modelo simple de regresión lineal correspondiente a: $pKa = m \cdot V_{c3} + n$, expresión más coherente que su contraparte correspondiente a la regresión multivariable. La aplicación del uso de la reducción de variables elimina el problema del proceso de ortogonalización de las variables o el uso de la Componentes Principales (PCA) para obtener modelos consistentes.

Palabras clave: Reducción.—Variables independientes.—Distancias euclidianas.

* **Información de contacto:**

Departamento de Química Inorgánica y Analítica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, Olivos 1007, Santiago, Chile. Fax: 56-2-7370567. Teléfono: 9782851.

e-mail: ecornwel@abello.dic.uchile.cl

ABSTRACT

Application of V_{c3} topographic QSPR parameters to benzene sulfonamida substances derivatives

A novel QSPR topographic parameter (V_{c3}) is used for independent variables reduction number to one. V_{c3} consisted in Euclidian distances relations. This procedure was applied to a model of 19 benzene sulfonamide derivatives substances using benzene sulfonamide like referent substance characterized by physico-chemicals properties used like independent variables, this variables are: refraction index, surface tension and an extra dummy variable that indicated the presence or absence chlorine atoms in the study molecule, pKa was used like dependent variable. The linear regression proposed is of the form. $pKa = m * V_{c3} + n$ that is more coherent than its counterpart multivariable regression. The used of this variable reduction eliminated problems of orthogonal procedure or the used Principal Component Analysis (PCA) to obtain consistent models.

Key words: Reduction.—Independent variables.—Euclidian distances.

INTRODUCCIÓN

Un novedoso parámetro V_{c3} utilizado como modelo matemático en la disciplina QSPR (Relación propiedad estructura química) es propuesto por el autor como un mecanismo general para reducir el número de variables independientes en las regresiones multivariadas.

El propósito de este artículo es extender esta idea propuesta para su aplicación en estructuras más complejas que los hidrocarburos saturados tratados con antelación (1) para obtener modelos más simples definidos como relaciones lineales con una variable V_{c3} independiente. Para este caso corresponde a la forma general $y = m * V_{c3} + n$ cuya variable independiente definida como V_{c3} para este caso expuesto es función de propiedades fisicoquímicas propias de las sustancias a tratar. El parámetro V_{c3} fue exitosamente aplicado a un grupo de 35 hidrocarburos saturados (1). En el presente trabajo se utilizó un número de 18 derivados del benceno sulfanilamida utilizando el benceno sulfonamida como sustancia de comparación. Cada derivado está representado por un conjunto ordenado $[X_i, Y_i, Z_i]$ en el cual cada elemento en mayúscula representa una propiedad fisicoquímica y el índice i representa una sustancia en particular. Para la sustancia de comparación (benceno sulfonamida) se define el conjunto ordenado

$[X_0, Y_0, Z_0]$. En ambos conjuntos, X representa el índice de refracción (IR), Y representa la tensión superficial (ST) y Z representa la variable auxiliar (2) (I) cuyo valor adquiere un valor 1 o 0 de acuerdo si la molécula contiene en su estructura átomos de cloro o no los contiene, respectivamente. Se estableció que el uso de otro conjunto distinto al establecido como $[X_0, Y_0, Z_0]$ en base a el benceno sulfonamida, como ejemplo, usar otra sustancia entre los derivados de esta sustancia señalada, conllevan a la obtención de regresiones de menor calidad estadísticas que la obtenida mediante el conjunto señalado. La causa de ello, es probablemente debida a las diferencias significativas entre esta sustancia base (benceno sulfonamida) y sus derivados en cuanto a las estructuras moleculares y las distribuciones electrónicas que las caracterizan.

El modelo propuesto en este trabajo se define por la relación $pKa = m \cdot V_{c3} + n$, siendo la variable independiente la distancia Euclidiana entre los pares ordenados de los conjuntos $[X_i, Y_i, Z_i]$ y $[X_0, Y_0, Z_0]$.

Se debe indicar que el modelo de regresión multivariable que relaciona pKa con las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias bajo estudio presentan como en todo caso general de este tipo de regresiones multivariadas magnitudes y signos de los parámetros multiplicativos de cada término contributivo del modelo incorrectos, que no interpretan el comportamiento de cada término en el total de la ecuación aún cuando el modelo sea adecuado para la obtención de las variables dependientes calculadas. Para tener concordancia total de estos modelos se hace necesario un proceso de ortogonalización de sus variables independientes (3). Además de ello, el número de variables independientes utilizados en las regresiones multivariadas deberá estar de acuerdo con el número de sustancias presentes que conforman el modelo. En caso contrario se obtienen coeficientes de determinación estadísticos (R^2) falsos por exceso (4) que no tienen proporción con las diferencias entre los valores experimentales y calculados por el modelo. Estas limitaciones encontradas en las regresiones multivariadas no existen para el modelo propuesto, los parámetros m, n quedan bien definidos como elementos de la recta representativa de la regresión lineal y el signo de la derivada de su función es consecuente con los signos de las derivadas correspondientes a cada elemento contenido en V_{c3} .

Los procesos químicos, fisiológicos, y patológicos en los cuales la constante de disociación pKa está involucrada están ampliamente investigados para el grupo de los derivados de las benceno sulfonamidas (2). Además, se ha demostrado que algunas derivados de las benceno sulfonamidas son agentes químicos importantes y se usan estas sustancias para el tratamiento de úlceras gastro-intestinal-duodenal, desórdenes neurológicos, glaucoma, debilidad causada por la altura, y algunas formas de tumor (2).

PROCEDIMIENTO

Las sustancias bajo estudio se caracterizaron mediante un grupo de seis propiedades fisicoquímicas. Éstas son: el índice de refracción molar (MRI), el volumen molar, la polarizabilidad, el índice de refracción molar (IR), la tensión superficial (ST) y la variable auxiliar. Todos estos datos se obtuvieron de literatura (2) (ver Tabla 1). De este conjunto de propiedades se eligió un grupo de tres propiedades, inherente a las sustancias con el cual se logró un modelo de regresión multivariable óptimo evaluado y comparado mediante los parámetros estadísticos comunes. Estos son el índice estadístico de determinación (R^2), la desviación estándar de la regresión (s. d.) y el índice de Fisher (F). El número de variables independientes ocupadas está en proporción con el número de casos (19 sustancias), de acuerdo a la bibliografía ya citada (4). La regresión óptima se eligió de un conjunto de 20 regresiones que implica el total de combinaciones posibles calculadas como: $C_3^6 = 6! / 3! 3! = 20$ regresiones con distintas combinaciones de a tres propiedades fisicoquímicas. La tríada óptima de la regresión multivariable óptima obtenida fue: [IR, ST, I]. La estructura particular de la regresión multivariable se señala en la ecuación 1:

$$\text{pKa} = -21.2724 (\pm 25.2200) + 24.3608 (\pm 16.7276) * \text{IR} - 0.1604 (\pm 0.0444) * \text{ST} - 0.5955 (\pm 0.2476) * \text{I} \quad (1)$$

$$R^2 = 89.1946$$

$$\text{s. d.} = 0.3351$$

$$F = 44.0200$$

El parámetro V_{c3} se obtuvo para cada derivado de la benceno sulfonamida a través de la relación de distancia Euclidiana entre el conjunto ordenado $[X_i, Y_i, Z_i]$ y el de referencia $[X_0, Y_0, Z_0]$ propio de la benceno sulfonamida, cuya estructura particular es [1.645, 60.700, 0]. La distancia para cada sustancia se calcula mediante la ecuación 2:

$$V_{c3} = [(X_i - X_0)^2 + (Y_i - Y_0)^2 + (Z_i - Z_0)^2]^{1/2} \quad (2)$$

Esta ecuación fue aplicada a los 19 derivados y los valores de V_{c3} se señalan en la Tabla 1. La regresión entre pKa y V_{c3} corresponde a la ecuación 3:

$$pKa = 9.0556 (\pm 0.1252) - 0.1061 (\pm 0.0104) * V_{c3} \quad (3)$$

$$r = -0.9235$$

$$s. d. = 0.3695$$

$$F = 104.39$$

Para el caso de la relación multivariable (1), la regresión pKa experimental vs. pKa calculado mediante la regresión 1 proporciona los siguientes parámetros estadísticos ($r = 0.9448$, s. d. = 0.3154, $F = 149.94$).

Para el caso de la relación (3) la regresión pKa experimental vs. pKa calculado mediante la regresión 3 proporciona los siguientes parámetros estadísticos ($r = 0.9237$, s. d. = 0.369, $F = 104.51$).

En la Tabla 1 se señalan tanto valores de pKa calculados a través de la regresión multivariable y sus errores respecto a los experimentales como los valores de pKa calculados mediante la relación 3 y sus errores respecto a los experimentales. Los pKa calculados para ambos casos, regresión multivariable y en función de V_{c3} no presentan diferencias estadísticamente para un 95% de confianza entre sus promedios, desviación estándares, mediana (prueba de: Mann-Witney W.) y distribución (prueba de Kolgomorov-Smirnov). Esto implica que no existen diferencias sustantivas entre ambos métodos de regresión, en cuanto a la evaluación de los pKa calculados.

Las regresiones y evaluaciones estadísticas se llevaron a término mediante los software Statgraphic y Origin (5, 6).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El método propuesto de regresión mediante la reducción de variables V_{c3} es más coherente con las funciones de regresión para el modelo lineal $y = m \cdot x$ de pKa *versus* el índice de refracción, pKa *versus* la tensión superficial y pKa *versus* variable independiente auxiliar (I) que las regresiones multivariantes. Se tiene que: la derivada $d(\text{pKa})/d(\text{IR})$ para la función pKa vs. (IR) es igual a -40.6151 , de la misma forma $d(\text{pKa})/d(\text{ST})$ para la función pKa vs. (ST) es igual a -0.1061 y $d(\text{pKa})/d(\text{I})$ para la función pKa vs. (I) es igual a -0.536 . Siendo la derivada $d(\text{pKa})/d(V_{c3}) = -0.1061$ se puede deducir que existe coherencia en los signos con las ecuaciones por separado, más aún, el modelo propuesto V_{c3} indica un mismo valor de derivada que $d(\text{pKa})/d(\text{ST})$ para la función pKa vs. (ST) señalando que la variable independiente (ST) sería la variable de mayor peso para un modelo multivariable. Si se evalúan las derivadas parciales del modelo multivariable se tiene que $(\delta(\text{pKa})/\delta\text{ST})_{\text{IR}, \text{I}} = -0.1604$ y $(\delta(\text{pKa})/\delta\text{ST})_{\text{IR}, \text{ST}} = -0.5955$, manteniéndose cierta similitud con los modelos con una sola variable independiente pero, $d(\text{pKa})/d(\text{IR})_{\text{ST}, \text{I}} = 24.3608$ valor que es incoherente en magnitud y signo con $d(\text{pKa})/d(\text{IR}) = -40.6151$, el segundo término de la regresión multivariable no explica ni el signo verdadero ni la magnitud de la contribución de la variable (IR) y en aquella relación, se compensa este factor positivo (24.3608) por medio de la magnitud y signo del término independiente (-21.2724) de tal forma que los valores calculados de pKa mediante un proceso de regresión multivariable y aquellos calculados por el método propuesto V_{c3} son estadísticamente equivalentes, como se indicó anteriormente. Este hecho particular señala la necesidad de un proceso de ortogonalización, reducción de variables no significativas por el método PCA o como alternativa la reducción de variables por el método propuesto. Se entiende en todo el texto como reducción no una eliminación si no una función de funciones.

Es necesario señalar que este procedimiento estudiado amerita mayores análisis pero desde ya se puede decir que es un método más sencillo que los métodos de ortogonalización o PCA.

TABLA 1. Sustituyentes químicos y parámetros fisicoquímicos usados en este estudio

Núm.	Sustituyente	pKa Exp.	MRI cm ³	Volumen molar	Polariza- 10 ⁻²⁴ cm ³	I.R.	ST dynes/cm	I	Vc ₃	pKa Calculada Ec. Multivar.	error %	pKa Calculada Ec. Función Vc3	error %
1	3,5-di-NO ₂	6,19	79,61	204	31,56	1,706	88,5	0	27,8001	6,09	1,61	6,11	1,37
2	3-NO ₂ ,5-Cl	6,92	78,4	204,6	31,08	1,692	77,6	1	16,9296	6,90	0,25	7,26	-4,90
3	4-NO ₂	6,97	73,58	192,6	29,17	1,689	76,8	0	16,1001	7,55	-8,37	7,35	-5,41
4	3-NO ₂ ,4-Cl	7,16	78,4	204,6	31,08	1,692	77,6	1	16,9296	6,90	3,60	7,26	-1,38
5	4-CN	7,36	72,11	190,7	28,58	1,680	74,7	0	14,0001	7,67	-4,22	7,57	-2,85
6	4-SO ₂ -NH ₂	7,45	79,98	209,7	31,7	1,687	76,7	0	16,0001	7,52	-0,95	7,36	1,24
7	3,5-di-Cl	7,54	77,2	204,7	30,6	1,678	67,8	1	7,1702	8,13	-7,87	8,29	-10,01
8	3-NO ₂	7,67	73,58	192,6	29,17	1,689	76,8	0	16,1001	7,55	1,52	7,35	4,21
9	3-SO ₂ -NH ₂	7,81	79,98	209,7	31,7	1,687	76,7	0	16,0001	7,52	3,71	7,36	5,79
10	3-CN	7,83	72,11	190,7	28,58	1,680	74,7	0	14,0001	7,67	2,03	7,57	3,32
11	3-Cl	8,28	72,37	192,7	28,69	1,674	66,4	1	5,7871	8,26	0,23	8,44	-1,95
12	3-CO-Me	8,34	76,91	212,3	30,49	1,644	62,3	0	1,6000	8,78	-5,31	8,89	-6,54
13	4-Cl	8,56	72,37	192,7	28,69	1,674	66,4	1	5,7871	8,26	3,50	8,44	1,39
14	3-O-Me	8,72	73,91	204,8	29,3	1,641	60,7	0	0,0000	8,97	-2,83	9,06	-3,85
15	H	8,97	67,54	180,8	26,77	1,641	60,7	0	0,0000	8,97	0,04	9,06	-0,95
16	3-N-Me ₂	9,01	80,68	218,8	31,98	1,658	63,6	0	2,9000	8,92	1,05	8,75	2,91
17	3-Me	9,05	71,89	205,8	28,5	1,653	61,3	0	0,6001	9,16	-1,25	8,99	0,64
18	4-Me	9,25	72,17	197,1	28,61	1,653	61,3	0	0,6001	9,16	0,94	8,99	2,79
19	4-O-Me	9,34	73,91	204,8	29,3	1,641	60,7	0	0,0000	8,97	4,00	9,06	3,05
20	4-N-Me ₂	9,46	80,68	218,8	31,98	1,658	63,6	0	2,9000	8,92	5,76	8,75	7,53

I, indica una variable independiente auxiliar. Se define este parámetro con un valor 1 para moléculas cloradas, en caso contrario su valor es 0. MRI implica el índice de refracción molar.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CORNWELL, E. (2006): New idea for the topological index evaluation and treatise multiple regression with three independent variables. Saturated hydrocarbons used like a model. *J. Chil.Chem. Soc.* 50: 765-768.
- (2) THAKUR, A. (2005): QSAR study on benzenesulfonamide dissociation constant pKa: physicochemical approach using surface tension. *Arkivoc* XIV 49-58.
- (3) RANDIC, M. (1997): On characterization of chemical structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 37: 672-687.
- (4) TOPLIS, J. C. and EDWARDS. R. P. (1979): Chancee factors in studies of quantitative structure activity relationships. *J. Med. Chem.* 22: 1238-1244.
- (5) Statgraphic Plus 5.1 Copyrighy 1994-2001 Statistically Graph Corp.
- (6) Origin 7312117. 0301 (B30019) Copyright 1991-2002 Origin Lab. Corporation. One Round Plaza Northampton, MA 01060 USA.

**Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo.
Señor Don Emilio Fernández-Galiano**



El Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano nació el 3 de agosto de 1923 en Barcelona. Tomó posesión como Académico de Número el día 27 de octubre de 1983 de la Medalla número 26. Falleció el día 5 de junio de 2006. La Sesión Necrológica se celebró el día 15 de febrero, participando el Excmo. Señor Don Jesús Izco Sevillano, el Excmo. Señor Don Gonzalo Giménez Martín, el Excmo. Señor Don Juan Ramón Lacadena y el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada. Fue presidida por la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**Emilio Fernández-Galiano, botánico.
Barcelona (3 de agosto de 1923) -
Madrid (5 de junio de 2005)**

JESÚS IZCO SEVILLANO
Académico Correspondiente

Excma. Señora Presidenta,
Excmas. y Excmos. Académicos,
Familiares y amigos de Emilio Fernández-Galiano,
Señoras y Señores:

Mi intervención inicia la sesión que la Real Academia Nacional de Farmacia ha organizado en recuerdo de Emilio Fernández-Galiano Fernández, a iniciativa de la Sección 2ª: Biología, Biotecnología y Farmacogenómica, por medio del Profesor Juan Ramón Lacadena. Además de mi condición de botánico y tal vez por encima de ella, mi presencia aquí tiene fundamento en la amistad de años y la convivencia en el desempeño de nuestras obligaciones en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Ello enlaza y trae a mi memoria las ocasiones en las que la vida cruzó nuestros caminos y me lleva al análisis del botánico y del significado de sus obras principales. En lo personal, permítanme que recuerde antes de empezar que Emilio, junto a otros de mis amigos, me instó primero y avaló después mis candidaturas como académico correspondiente y luego como académico numerario para formar parte de esta Institución. No es necesario declarar que siempre le agradecí aquellas manifestaciones de respeto y consideración, pero aprovecho esta ocasión para hacer público ese agradecimiento.

Aunque nacido en Barcelona, el traslado de su familia le llevó a Madrid donde se licenció en Farmacia (1945) por la Universidad Complutense. Tras sus estudios farmacéuticos leyó su tesis doctoral, dirigida por Salvador Rivas Goday (1950) y al poco se licenció en Biología (1951), por la misma Universidad madrileña. En los años difíciles de la posguerra se inicia por tanto la vida botánica de Emilio Fernández-Galiano, que A. Ramos (2006) resume en las páginas que, con motivo de su fallecimiento, dedica a su memoria en la revista *Botanica Complutensis*, «...su vocación naturalista fue impulsada precozmente por su padre Don Emilio Fernández-Galiano, y aleccionada por quienes siempre consideró sus maestros en el saber científico, Don José María Albareda Herrera y, especialmente, Don Salvador Rivas Goday, quien le inició en el conocimiento botánico». Los mismos referentes académicos que cita el propio Galiano en su discurso de ingreso en esta Academia (Fernández-Galiano, 1983).

Tras ambas licenciaturas desarrolló actividades docentes en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense (1946-1962). Primero como Ayudante de Clases Prácticas de Botánica y más tarde como Profesor Adjunto en la cátedra de Geología Aplicada, que dirigía José María Albareda. Con independencia de la adscripción administrativa de cada tiempo simultaneaba su presencia y su trabajo en ambos laboratorios. De aquellos lejanos años le recuerdo con bata blanca cuando yo cursaba las asignaturas de Botánica y frecuentaba con mis compañeros los laboratorios de la cátedra, para que nos clasificasen alguna planta o para repasar las que estaban expuestas en las vitrinas del pasillo, algo fundamental si se quería aprobar el examen práctico.

En mi intervención me centraré en Emilio Fernández-Galiano como botánico, ya que otros aspectos son glosados por los otros académicos que participan en este homenaje conmemorativo o se han tratado en otros actos análogos y en las publicaciones que derivaron de ellos o independientes (Ramos, 2005; Valdés, 2005, Valdés *et al.*, 2006), la nota necrológica de Diego (2006) incluye la relación de trabajos publicados. No es fácil descomponer la vida de un hombre en fragmentos. Todos los hechos, todas las decisiones de un hombre forman parte de un todo, somos individuos, en el sentido etimológico de la palabra somos no divisibles. Somos además lo que nos rodea, fruto de nuestro tiempo, de los medios en los que nos desarrollamos y de las personas con las que nos relacionamos. Lo cual es una forma de

repetir la idea, tantas veces citada, de uno de nuestros más célebres filósofos. Sin embargo, en la imposibilidad de abarcarlo todo conjuntamente, más si ha de ser de forma breve, reducimos los análisis a aspectos o campos particulares. Algo que hacemos habitualmente en nuestro trabajo científico y así lo hago ahora. Incluso limitado al campo de la Botánica he renunciado a un análisis amplio y apenas esbozo algunos trazos relacionados con hechos y aportaciones que considero principales en su vida profesional.

Quiero destacar en primer lugar su tesis doctoral. Lleva por título «Preclímax y postclímax de origen edáfico». Fue dirigida por Salvador Rivas Goday y leída el 14 de abril de 1951. De inmediato fue publicada bajo la firma de director y doctor en los Anales del Jardín Botánico de Madrid (1952). Ya he indicado en otra ocasión que Salvador Rivas Goday dirigió tesis avanzadas, innovadoras, muy en línea con las preocupaciones científicas de su tiempo (Izco, 2004). A estos criterios responde la tesis de Emilio Fernández-Galiano.

El concepto de clímax ha sido una de los más discutidos y polémicos de la ciencia de la vegetación, tomada como parte de las ciencias ecológicas, lo que ha sido causa de que los ecólogos hayan participado igualmente en la discusión. El concepto de clímax fue elaborado por F. E. Clements en torno a la primera década del siglo XX. Clímax, escala en griego, es término que responde a un tropo gramatical con referencia a la etapa última de la sucesión temporal de distintas comunidades vegetales en el mismo espacio. El origen de las discusiones no venía de reducir la secuencia en conjunto al último peldaño, eso mismo hacemos en el lenguaje común al hablar de clímax como el momento culminante de un proceso o de una acción. Los problemas estaban ligados a su carácter determinista y si el clima general (macroclima) era capaz de homogeneizar la etapa final de la sucesión, con independencia de otros factores ambientales, principalmente edáficos y topográficos, pensamiento que se expresaba como «Teoría de la monoclímax». En otros términos si la clímax era común en escalas muy pequeñas y era equivalente a grandes formaciones ecológico-fisonómicas o si la clímax se manifestaba en escalas mayores mediante comunidades vegetales diferentes; en otros términos, si en un mismo territorio existían modelos de sucesión diferentes y existían distintas clímax condicionadas por factores locales, modelo conceptual conocido como «Teoría de la policlímax».

En esa encendida discusión de entonces, hoy apagada por resuelta, a favor de las climax locales, se inserta la tesis del botánico que recordamos en esta sesión. La publicación se inicia con una breve y concisa definición de los conceptos de climax, preclimax y postclimax. A partir de ahí, los autores se adentran en los conceptos relacionados con la climax y los desarrollan de manera práctica, con ejemplos concretos referidos a la vegetación española.

Como punto de partida identifican las climax con las formaciones ecológico-fisonómicas de Brockmann-Jerosch y Rübél y establecen sus relaciones, basadas en las condiciones de humedad y de temperatura, «...para matizar variantes dentro de las grandes formaciones; y de esa manera comenzamos a separarnos del antiguo concepto geobotánico de la uniformidad en el óptimo de las climax, o sea de la “teoría de la monoclimax”» (*op. cit.*, 460). A partir de esa premisa consideran la influencia de la humedad edáfica y de la naturaleza del sustrato para identificar y definir las preclimax y postclimax de la vegetación española, «...advirtiendo desde ahora que el antiguo concepto rígido de la climax ha sido sustituido por el más moderno de la teoría de la policlimax» (*op. cit.*, 476). Todo sobre la base que en un territorio las condiciones de xericidad determinan preclimax y los medios más húmedos llevan a tipos de vegetación que se deben interpretar como postclimax (Figura 1).

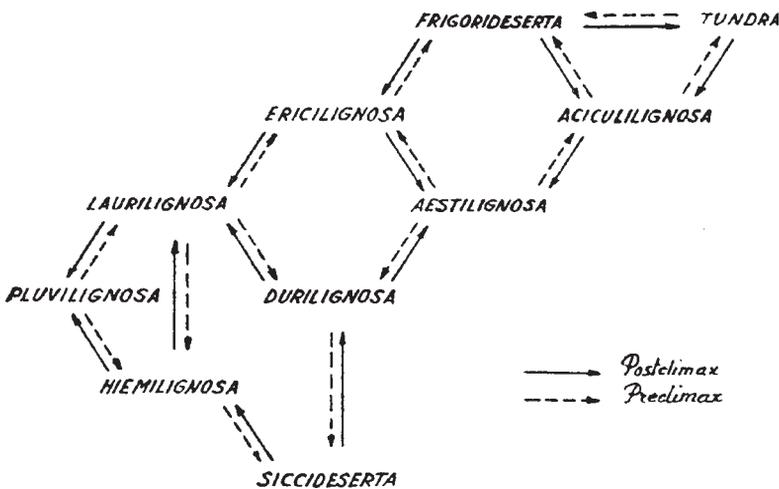


FIGURA 1.

El estudio abarca una buena parte de España y toma ejemplos de numerosos tipos de vegetación del país, información que previsiblemente venía de la ya entonces amplia experiencia de Salvador Rivas. Sin embargo, el trabajo lleva también la impronta del joven doctor, que se manifiesta en los numerosos análisis edáficos ligados a las comunidades vegetales; se analizan por horizontes cloruros, sulfatos, carbonatos y se determina el pH. Aunque la relación suelo/vegetación cuenta en España con los magníficos antecedentes de Emilio Huguet del Villar, la consideración añadida de los procesos de sucesión a esa relación es original y avanzada a su tiempo. Esta conjunción afortunada no era fruto de la casualidad. Salvador Rivas tenía una buena formación en el análisis químico y su concepto de vegetación implicaba el substrato, con diversas publicaciones en esa línea, por otro lado la política científica de Rivas Goday estuvo marcada por la relación con los edafólogos (Izco, 1975). Por si eso fuera poco el propio Fernández-Galiano mantuvo permanentemente una relación estrecha con el Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia de Madrid y fue Profesor Adjunto en él.

Tras su tesis marchó a Toulouse (Francia), en 1952, para seguir entonces un avanzadísimo curso titulado «Identificación de la vegetación por la fotografía aérea», organizado por H. Gaussen; luego mantuvo contactos con el alemán R. Tüxen, finalmente marchó un año a Quebec (Canadá) (1955-1956), para trabajar con P. Dansereau (Rivas Martínez, 1983). Henri Gaussen era un célebre botánico y fitogeógrafo francés, de amplia formación que abarcaba la sistemática, cartografía, climatología, etc., de amplia proyección mundial; Reinhold Tüxen ha sido uno de los maestros indiscutibles de la Fitosociología, con discípulos directos procedentes de todos los países europeos, así como de los principales estudiosos de la vegetación en Japón; Pierre Dansereau es, casi centenario, una de las figuras más señaladas en el campo de la Ecología, Fitosociología, Cartografía y otras ciencias relacionadas con estas principales. Con estos antecedentes no cabe duda de la confianza de sus mentores en las cualidades del joven Emilio Fernández-Galiano y del proyecto de hacer de él uno de los pivotes sobre los que se desarrollarían las ciencias de la vegetación en España. Sin embargo, Galiano orientó su vida académica en otra dirección.

Mediada la década de los años sesenta, la universidad española inicia un tímido despegue con la creación de nuevos centros y dotación de nuevas plazas al servicio de la docencia y de la investigación. Esta fase expansiva vino motivada por necesidades objetivas, el incremento de alumnos que accedían al nivel universitario y la presión de estos mismos en los centros con quejas sobre la masificación. En ese contexto se creó una Sección de Biología en la Facultad de Ciencias de Sevilla (1964), que ya contaba con otras secciones, entonces reunidas en una sola facultad, como ocurría en el resto de España. Botánica fue la primera cátedra que se dotó en la nueva sección y a ella se incorporó Emilio Fernández-Galiano como primer catedrático de aquel centro (11-XI-1965), «...cuyas cátedras ocupamos una serie de doctores (muchos de nosotros procedentes del CSIC) ya con la suficiente preparación para desempeñarlas...» (Fernández-Galiano, 2001).

Puedo imaginarme su llegada a Sevilla, aunque sólo sea por mi experiencia personal al llegar a León como Profesor Agregado de Botánica (1970), el primer numerario que se incorporó a aquel centro, entonces dependiente de la Universidad de Oviedo. Como es fácil imaginar en Sevilla se partía de cero, con carencias de todo tipo, que iban desde la necesidad de poner en marcha un equipo de trabajo a la tarea de construir un sistema académico y administrativo en la Facultad. Situación que no era muy diferente de la vivida por el propio Galiano como estudiante, con universidades «...deshmanteladas, empobrecidas material y culturalmente y carentes de lo imprescindible (y no digamos de lo prescindible). Perteneíamos a unas generaciones que, debido a los cambios sociales a nivel nacional y mundial, habían sufrido (y empleo el término en sus dos principales acepciones, especialmente la segunda: “sentir un daño moral”), habían sufrido, digo, las turbulencias políticas por las que había pasado España desde nuestra infancia» (Fernández-Galiano, 2001). En esa tarea desde los cimientos participó Emilio junto con otros profesores recién incorporados, desde la dirección del nuevo Departamento de Botánica y desde el Decanato (1969-1972).

En la capital andaluza Galiano tuvo oportunidad de expresar sus excepcionales dotes de organizador y de profesor avezado, capaz de espigar los más prometedores entre sus jóvenes alumnos. No es fácil levantar un departamento universitario y menos aún una facultad,

pero con decisión y habilidad, junto a sus buenas relaciones, consiguió en pocos años un centro homologable con los de otras universidades. Sus cualidades ya se habían puesto de manifiesto antes y volvieron a hacerse patentes después en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas o al frente del MAB (Man and Biosphere) en España, proyecto de la UNESCO que se materializó en la inclusión de la reserva de Urdaibai (Vizcaya) en ese marco general de protección de la naturaleza.

La llegada de Emilio Fernández-Galiano a Sevilla estuvo ligada a un primera fase expansiva de la universidad española y, a la vez, a un desarrollo de la ciencia en general, como respuesta a la recuperación económica y científica que tuvo lugar dos décadas después de finalizada las contiendas militares que arrasaron el mundo en aspectos económicos, científicos y morales. En el campo de la Botánica en concreto se producía en aquellas fechas una renovación generalizada, que se expresaba sobre todo en el mundo anglosajón, con incorporación de nuevos paradigmas y nuevas técnicas de trabajo. En ese marco se inserta el desarrollo de la Biosistemática, la Taxonomía experimental, la Taxonomía numérica, el uso generalizado de los datos cromosómicos, la Quimiosistemática, etc.

El nuevo campo de juego no entraba en contradicción con el uso del herbario como apoyo elemental en el trabajo botánico. Más bien lo potenciaba. Desde ese punto de vista, el recién llegado catedrático se planteó la vuelta a Sevilla de los herbarios que habían salido de allí para el Real Jardín Botánico de Madrid, en 1943 (Salguero y Talavera, 1997). El volumen de aquellos materiales alcanzaba casi 12.000 pliegos, procedentes de los herbarios de Pedro Abat, de los hermanos Claudio y Esteban Boutelou y el antiguo herbario general sevillano. Si importante era el número, sobre todo en un país entonces con escasas recolecciones asequibles, era más importante su valor botánico e histórico, pues incluían recolecciones de los primeros viajes científicos por Andalucía, del siglo XVIII y posteriores.

Aquella semilla germinó y creció con el tiempo hasta alcanzar 25.000 pliegos a la marcha del primer titular de la cátedra sevillana, en 1976. Hoy el herbario SEV, su matrícula internacional en el *Index Herbariorum*, posee 175.000 pliegos registrados y es uno de los herbarios más importantes del país. Sus fondos han sido fundamentales

para la redacción de la *Flora de Andalucía Occidental* y las nuevas accesiones de la porción oriental de ese territorio más los procedentes del Norte de África son la base de los nuevos proyectos del Departamento actual.

La labor en el herbario y el conjunto de actividades y publicaciones no son, obviamente, fruto de una persona sola. A ello contribuyeron también los jóvenes botánicos que se incorporaron a la cátedra sevillana de Botánica. Al poco de incorporarse el nuevo catedrático entró en el Departamento Benito Valdés (1967) y al poco Santiago Silvestre (1968). Sin duda resultó atractiva la nueva savia botánica entre los jóvenes alumnos de Sevilla, pues rápidamente algunos de ellos se vincularon al grupo de trabajo del nuevo catedrático. De la primera promoción se incorporó Eugenio Domínguez Vilches y de la segunda promoción entraron en el equipo Baltasar Cabezudo Artero y Salvador Talavera Lozano. Algo más tarde lo hizo Juan Antonio Devesa Alcaraz y luego otros en segunda generación o posteriores hasta completar todo un cuadro de prestigiosos botánicos en las universidades andaluzas.

Todos los mencionados y algunos más son hoy catedráticos de universidad, mayoritariamente orientados a la Taxonomía, aunque también se han abierto nuevas líneas de trabajo o se han retomado ocasionalmente antiguas vías en el estudio de la vegetación. Esta explosión de botánicos nucleados en torno a una persona y ligados a un espacio concreto tiene mucho que ver con lo que los ecólogos llaman «efecto fundador» para expresar la multiplicación y deriva genética de un pequeño grupo de individuos que inician aisladamente una población nueva. El fenómeno no se restringe a la Botánica ni a un tiempo determinado, por el contrario se repite con frecuencia en la evolución de la universidad española y en ámbitos industriales, comerciales, etc. Es un caso más de paralelismo entre los fenómenos biológicos y los sociológicos que nos lleva a comprender lo artificial de la división de campos de conocimiento, al menos en ciertos aspectos.

El grupo de botánicos nacidos de la raíz sevillana tiene en su haber la publicación de la *Flora de Andalucía Occidental*, entre otros frutos, que debo resaltar en esta pequeña historia. Del paso frecuente de Vernon H. Heywood por España, al abrigo del CSIC, surgió la

amistad entre el eminente botánico británico y Emilio Fernández-Galiano. Como primer resultado de aquella conexión un joven Benito Valdés marchó a Edimburgo para formarse en Taxonomía Vegetal. El momento era el más apropiado pues, como he indicado, en aquellos años se estaba produciendo una auténtica revolución en el campo de la Botánica y el colaborador de Galiano volvió a los dos años con nuevos conceptos sobre el estudio y la clasificación de las plantas. «Benito was then able to start the first modern taxonomy school in Spain and train a whole series of students who later occupied important posts» (V. H. Heywood, *in litt.*).

El proyecto de la *Flora* se inició en 1971 con el catálogo de la provincia de Sevilla, al que siguieron otros, así como la definición de la obra (1978), que se publicó en 1987. Consta de tres tomos de los que son editores principales Benito Valdés, Salvador Talavera y Emilio Fernández-Galiano, con un Comité Científico compuesto por los tres anteriores más Baltasar Cabezudo, Juan Antonio Devesa, Eugenio Domínguez y Santiago Silvestre. El grupo sevillano al completo en la dirección de la obra, a los que se suman 35 autores y colaboradores de distinto tipo y condición. La flora abarca las provincias andaluzas occidentales (Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla) y suma 2.332 especies, que por aproximación suponen un tercio de la flora ibérica.

La obra supone un salto cualitativo de importancia en los estudios botánicos españoles. El diseño tiene como base la *Flora Europaea*, que tan bien conocía Galiano, pues había colaborado en el proyecto continental como Asesor Regional (España) desde el volumen II (1968-1980) y por el propio B. Valdés a partir de su periodo de formación con Vernon H. Heywood, uno de los promotores y editores de la flora. Esa base continental, de gran rigor y novedosa por su concepción, es sobrepasada por la *Flora de Andalucía Occidental* en algunos aspectos. Con la europea coincide en el uso de floras básicas de referencia, la estructura de las claves, los modelos de citación de los nombres de los taxones, las diagnosis, los datos cromosómicos, hábitat, fenología, etc. La mejora en la inclusión de iconos de cada uno de los taxones citados, casi 2.500 dibujos realizados en su mayoría por Antonio Cadete, quien «retrata» las plantas y sus caracteres diagnósticos con apenas unos trazos; la elección del dibujante de Elvas (Portugal) estuvo condicionada sin lugar a dudas

por la amistad de Galiano con José Malato Beliz, profesor de universidad en esa localidad portuguesa.

Supone también un avance sobre la flora de referencia la forma de indicar la distribución de las plantas, no por territorios administrativos sino por espacios naturales. Frente a la presencia por países de *Flora Eurpaea*, la andaluza incluye un mapa de comarcas, en el que se anota la pertenencia de cada taxón a una u otra. La distribución se vincula además con una de las primeras propuestas de división biogeográfica de la Península Ibérica de Salvador Rivas Martínez.

A la responsabilidad de Editor General, Galiano añadió su trabajo como autor en la redacción de algunas familias: Ulmáceas, Moráceas, Fagáceas, Betuláceas, Caparáceas, Arecáceas, etc., y como editor de familias como Urticáceas, Clusiáceas, Resedáceas y Poligaláceas.

Para acabar traigo aquí una pincelada de la última etapa académica de Emilio Fernández-Galiano, en la que de nuevo se cruzaron su vida y la mía, una etapa de cambio en la universidad española, tan lejana que resulta desconocida para la mayoría de los profesores actuales. En octubre de 1976 tomó Galiano posesión de la cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense. Por entonces yo estaba en el mismo departamento, con categoría «UDI». En realidad era Profesor Agregado, pero Salvador Rivas Martínez me adjudicó jocosamente la condición de «Unidad Docente Independiente», que en serio suponía plena responsabilidad docente e investigadora y presupuesto individualizado, algo entre novedoso y revolucionario en aquel tiempo, que no era bien visto por algunos catedráticos y desataba la sana envidia de mis compañeros agregados. A la marcha de Rivas a la Facultad de Farmacia de la misma universidad mi condición «UDI» dentro del Departamento estuvo a punto de quebrarse y habría perdido mi condición si Emilio no hubiese defendido mi posición ante quien tenía en él más fuerza administrativa que yo. Como contrapunto, hoy todo el mundo es «UDI» en la Universidad. Son rechazables los comportamientos propios del «Viejo Régimen», más en el ámbito académico, donde la libertad y la responsabilidad son esenciales para el progreso, pero no parece que la atomización y dispersión actuales sean los planteamientos más adecuados para la optimización de los recursos humanos ni que los incentivos para reparar la situación den

los resultados apetecidos para estructurar y coordinar los equipos. La muerte de Emilio Fernández-Galiano revolvió la memoria y los sentimientos e hizo aflorar viejos recuerdos. Al hilo de este último es el momento de agradecer aquella actitud de mi amigo el Profesor Salvador Rivas, así como la defensa del compañero y amigo que hizo Emilio Fernández-Galiano.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DE DIEGO, F. (2006): *In memoriam*. Profesor Emilio Fernández-Galiano Fernández (1923-2006). *Anal. Real Jard. Bot. Madrid*, 63: 253-256.
- (2) FERNÁNDEZ-GALIANO, E. (1983): Estado de la ciencia biológica en España. Discurso de ingreso Real Academia de Farmacia. Madrid.
- (3) FERNÁNDEZ-GALIANO, E. (2001): Homenaje a Enrique Montoya. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.
- (4) IZCO, J. (1975): Datos biográficos y bibliografía del Profesor Salvador Rivas Goday. *Anales Inst. Bot. A. J. Cavanilles*, 32: 9-32.
- (5) IZCO, J. (2004): Semblanza de Salvador Rivas Goday: huellas en el recuerdo. En: A. González Bueno (coord.) Marcelo Rivas Mateos, Salvador Rivas Goday, Salvador Rivas Martínez. *Tres Catedráticos en la Universidad de Madrid*, p. 79-89. Universidad Complutense de Madrid & Consejería de Sanidad de la C. A. Madrid.
- (6) MOLINA, A. (1990): Índice de los Trabajos del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal y de Botánica Complutensis. 1968-1990. *Botanica Complutensis*, 16: 121-128.
- (7) RAMOS, A. (2006): En memoria. Profesor Emilio Fernández-Galiano Fernández. *Botanica Complutensis*, 30: 191-195.
- (8) RIVAS GODAY, S. & FERNÁNDEZ-GALIANO, E. (1952): Preclímax y postclímax de origen edáfico. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 10: 453-517.
- (9) SALGUERO, F. J. & TALAVERA, A. (1997): Herbarios históricos de la Universidad de Sevilla: contenido, interés y estado de conservación. *Bol. As. Herbarios Ibero-Macaronésicos*, 3: 4-7.
- (10) VALDÉS, B. (2006): Emilio Fernández-Galiano Fernández. Catedrático e impulsor del Jardín Botánico de Madrid. *El Mundo* (26-6-2006): 6.
- (11) VALDÉS, B.; TALAVERA, S. & SILVESTRE, S. (2006): Emilio Fernández-Galiano Fernández (1923-2006). *Lagascalía*, 26: I-VII.

IN MEMORIAM

Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano (1923-2006)

GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN
Académico de Número

Excma. Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excmas. Señoras y Señores Académicos.

Queridos familiares y amigos del Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano Fernández.

Estimados amigos:

Es para mí un gran honor el pronunciar unas palabras en memoria y recuerdo de Emilio Fernández-Galiano, del amigo entrañable y siempre presente en el diario quehacer desde hace tantos años, lo que al volver la vista atrás, trae consigo vivencias de juventud y alegrías del pasado.

Gracias a los Académicos de la Sección segunda de esta Real Academia, que tuvieron a bien el proponer mi nombre para que pronunciase unas palabras en el día de hoy. Gracias porque ello me permite el entrelazar pensamientos que la mente va elaborando a medida que en ella se instala con su mucho de angustia y sensaciones de aflicción y de pesar, la despedida de una persona querida que nos ha dejado para siempre y a la que siempre le he dispensado afecto y cariño.

Pienso que en estas ocasiones en que la Real Academia promueve estas manifestaciones de recuerdo produce sensibilidades para que los asistentes rememoren días, hechos y anécdotas vividas junto a la persona que se recuerda y con ellos se cree un ambiente de sosiego y paz que se desea transmitir a aquéllos que rodearon en vida al ser querido.

Yo conocí a Emilio Fernández-Galiano hace muchos años. Eran mediados de los años cuarenta del pasado siglo. Por aquel entonces el plan de estudios de la carrera de Farmacia tenía un primer curso al que llamaban «Preparatorio», que se realizaba en la Facultad de Ciencias. La ubicación de las diversas asignaturas se encontraba, ya en la Ciudad Universitaria, ya en un pabellón existente en un patio interior del conjunto en que se encontraba el Casón de San Bernardo. Matemáticas, Físicas y Químicas se dictaban en los edificios recién restaurados de la Facultad de Ciencias, mientras Biología y Geología se daban en el vetusto recinto de San Bernardo.

Como ustedes comprenderán, si tres asignaturas se realizaban en un lado y otras dos en otro, en diferentes días de la semana, y cada una de ellas con una periodicidad de tres horas semanales, permite suponer la coincidencia en el mismo día de sesiones localizadas en distintos lugares cuyas diferencias horarias obligaban a los jóvenes estudiantes a salir, a paso ligero, desde la Ciudad Universitaria al centro de Madrid a fin de poder asistir a las diferentes clases. Yo era en aquel entonces uno de aquellos jóvenes.

Pues bien, los profesores que teníamos en San Bernardo desarrollaban su docencia conjuntamente para los alumnos de Farmacia y de las llamadas, en aquel tiempo, Ciencias Naturales. Allí en la Universidad oí por primera vez hablar de la célula y la persona que la describía se llamaba Emilio Fernández-Galiano. El primer Emilio Fernández-Galiano que conocí. Y es verdad que el recuerdo de aquellas lecciones y de aquel hablar pausado y sosegado jamás se olvidarán.

Al siguiente curso, segundo de la carrera y primero de la Facultad de Farmacia, en el inicio del mismo, allá por el mes de octubre, el entonces Catedrático de Botánica, don Salvador Rivas Goday, miembro de esta Corporación, daba comienzo a sus ilustrativas y pedagógicas excursiones por los alrededores de Madrid y en especial por la sierra cercana del Guadarrama con la recolecta de hongos y hele-

chos. En aquella, para mí, primera excursión, conocí al segundo Emilio Fernández-Galiano. Era un jovencito, un poco mayor que los alumnos, que vestía y aun lo recuerdo, una cazadora de cuero de color claro y seguía la marcha por el campo al lado siempre de don Salvador. Alguien entonces nos dijo quién era esa persona: Emilio Fernández-Galiano, hijo de don Emilio y que por aquel entonces empezaba su Ayudantía de Clases Prácticas de Botánica Descriptiva en la Facultad de Farmacia. Muy recientemente había finalizado la licenciatura con Sobresaliente y Premio Extraordinario y en ese curso daba comienzo a su carrera docente.

En el curso iniciado en 1948 se cambió el ámbito de los estudios de Emilio Fernández-Galiano alcanzando la Adjuntía en Geología Aplicada y Edafología, siendo entonces catedrático de esta asignatura don José María Albareda Herrera, miembro también de esta Real Academia. El Profesor Fernández-Galiano permanecería hasta 1960 al lado de Albareda hasta que éste dejó la Cátedra y le sustituyó Fernández-Galiano durante el curso 1960-1961. En 1950 había culminado sus estudios en Farmacia con el Doctorado, por el cual recibió Premio Extraordinario, y en 1952 la Licenciatura en Ciencias Naturales.

El 27 de octubre de 1983, el Profesor Emilio Fernández-Galiano ingresaba como Académico de Número en esta Real Corporación y en su discurso de Toma de Posesión de la medalla número 26 manifestó: «Escuché no hace mucho al Director de esta Real Academia en ocasión de un acto entrañable, que “hay fidelidades” que ahora no son rentables, y se refería a la enorme figura de don José María Albareda Herrera, uno de los más insignes académicos que han pertenecido a esta Real Academia y del cual, suscribiendo la bancarrota de la actual falta de rentabilidad de su recordación, me declaro discípulo y amigo. Mis largos años de convivencia con él en la Cátedra de Geología Aplicada de la Facultad de Farmacia donde desempeñé durante años la labor de Profesor Adjunto, me permitieron conocer aspectos de su carácter que sólo la continua relación Catedrático-Discípulo permiten percibir. Solía decir Albareda que la fecundidad se demostraba no haciéndose imprescindible, pero, a pesar de haber sido un hombre extraordinariamente fecundo, su ausencia se hace cada vez más patente, especialmente en estos tiempos de transformaciones en la Universidad y en las Instituciones Científi-

cas...» «Me hubiera gustado contagiarme de su entusiasmo, estar dotado de su gran inteligencia y ejercer su enorme, su increíble humildad». Esto lo decía Emilio Fernández-Galiano en 1983, como ya he dicho.

Traigo a colación estas palabras de nuestro recordado amigo en unos momentos en que se ha realizado la tropelía de cambiar el lugar en que se encontraba el busto del Profesor Albareda, de su ubicación al lado del antiguo Instituto de Edafología que él creó y frente al edificio central del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del que él fue su promotor y en el que actuó como Secretario General durante 27 años. En estos momentos en que la mediocridad culposa ha ido adquiriendo carta de naturaleza, me declaro yo, reiteradamente, su discípulo y amigo; 23 años después de que Emilio Fernández-Galiano lo declarase en esta Real Academia.

Emilio Fernández-Galiano estuvo, de una u otra manera, siempre muy vinculado al Consejo Superior de Investigaciones Científicas desde la segunda mitad de la década de los años cuarenta en que entró como becario, a finales de los cincuenta como Colaborador Científico e Investigador en los primeros años sesenta. Fue en esta época, el 29 de marzo de 1960 en que fue nombrado Vicesecretario del Jardín Botánico de Madrid y del Instituto Botánico del Consejo Antonio José de Cavanilles, cuando se comenzó a mostrar la gran labor que como gestor realizaría durante toda su vida el Profesor Fernández-Galiano ya, en principio, con la construcción de nuevos invernaderos, ya en el magnífico edificio de investigación que alberga actualmente el centro del Consejo cuya financiación se debe en una parte sustancial, a la incansable y eficaz labor de Fernández-Galiano introduciendo mejoras sustanciales en las condiciones en que se encontraba el riquísimo patrimonio del Jardín Botánico y de sus fondos bibliográficos.

Nada pasaba desapercibido a la visión gestora de Fernández-Galiano y a él se debió la propuesta de reorganización del personal laboral del Jardín y de su adscripción al C.S.I.C.

Emilio Fernández-Galiano obtuvo la Cátedra de Botánica de la Universidad de Sevilla en 1965 y a ella dedicó su mucho saber en el estudio taxonómico de las especies botánicas andaluzas y su mucho hacer en la formación de un magnífico plantel de jóvenes botánicos,

así como de la organización de la Botánica en las Facultades de Ciencias y de Farmacia como decano de la primera entre 1969-72 y de la segunda desde 1974 al 76, recibiendo el nombramiento de Decano Honorario de esta última Facultad. En el año 1976 regresa a Madrid ocupando una de las Cátedras de Botánica de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense y con ello se actualizaba entre nosotros una nunca olvidada relación personal y académica.

El nombramiento del profesor Fernández-Galiano como Consejero de Número del Consejo Superior de Investigaciones Científicas le vinculó permanentemente a esa Institución; su nombramiento como Académico de Número de esta Real Academia lo hizo para siempre de esta Casa.

Con un sentimiento de profunda y sincera amistad que se encuentra en el corazón, reciban su señora, hijos y demás familiares y amigos mi más expresivo sentimiento de aprecio hacia el amigo que se nos ha ido y con él el recuerdo a su memoria. Descanse en la paz del Señor.

Emilio Fernández-Galiano Fernández, profesor universitario

JUAN RAMÓN LACADENA CALERO
Académico de Número

Sean mis primeras palabras de agradecimiento al Profesor Emilio Fernández-Galiano Fernández porque, gracias a él, yo estoy hoy aquí como Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia honrando su memoria como profesor universitario. En efecto, una mañana de 1995 se presentó Emilio en mi despacho de la Facultad para preguntarme si aceptaría el nombramiento de académico numerario de esta Corporación en caso de ser elegido. A continuación me explicó que había salido la convocatoria de la Medalla número 1, vacante por el fallecimiento de nuestro compañero de claustro universitario el Profesor Alfredo Carrato Ibáñez, y que él estaría dispuesto a presentar mi candidatura, cosa que hizo en compañía de los académicos don Ángel Santos Ruiz y don Salvador Rivas Martínez.

Tuve además la satisfacción de que esta Corporación designara a Emilio Fernández-Galiano para que contestara a mi Discurso de Ingreso y nunca olvidaré las emotivas palabras con que se refirió a mi persona:

«Es costumbre en las Academias, cuando se trata de cubrir una plaza vacante de Académico de Número, celebrar entre sus miembros conciliábulos oficiosos, a veces en los mismos pasillos, discutiendo amistosamente sobre los méritos y peculiaridades científicas y humanas de los aspirantes. En uno de estos cambios de impresiones trataba yo de ilustrar a algunos colegas sobre las virtudes que adornan a nuestro hoy recipiendario, resaltando su ambivalencia como doc-

to en Genética y en Bioética, su larga experiencia docente e investigadora y su interesantísima obra como divulgador de la ciencia, cuando un venerable compañero académico [en referencia a don Ángel Santos Ruiz] que me escuchaba atentamente emitió su sentencia, con la seguridad que confieren los muchos años de vida y de experiencia: “y, además, es una buena persona”. Si bien es cierto que la calidad de una persona no debe figurar como condición prioritaria para ingresar en nuestra Corporación, que se encuentra, por otra parte, rebosante de buenas personas, hoy se comenta favorablemente “la necesidad de recuperar el valor de ser buena persona” ante la degradación moral que en muchos aspectos está sufriendo nuestra sociedad, por lo que no era baladí, en modo alguno, la observación de nuestro veterano compañero. Pero la condición de buena persona, en el caso de Lacadena, que no en el de todo el mundo, va acompañada de otras particularidades que lo convierten en un hombre, no sólo adecuado, sino necesario para nuestra Academia...»

Además, es de justicia resaltar que en cierta ocasión participé como miembro del jurado en una comisión que, actuando con objetividad, dictaminó en contra de los intereses del profesor Fernández-Galiano y, sin embargo, él nunca me guardó rencor, como bien lo demuestra el haber apadrinado mi acceso a esta Real Corporación. Como de bien nacidos es ser agradecidos, me sentía obligado a hacer pública esta circunstancia. Tendría que decir, por el contrario, que por la misma actuación de aquella comisión, otro profesor de la Facultad me negó la palabra para siempre.

En numerosas ocasiones pude comprobar en el quehacer universitario diario la capacidad dialogante del profesor Fernández-Galiano para afrontar las situaciones por complicadas que fueran. Recuerdo sus intervenciones conciliadoras y plenas de sentido común en Junta de Facultad en tiempos universitarios difíciles y crispados.

Uno de sus primeros discípulos, el Profesor Benito Valdés Castriellón, Catedrático de la Universidad de Sevilla, escribía de él en un obituario publicado en el periódico *El Mundo* (cito textualmente) que «desde el punto de vista humano, Galiano era afectuoso, afable y un tanto paternal con sus discípulos. De genio vivo, quienes hemos

tenido el honor de colaborar con él sabemos bien las reacciones a veces fuertes con las que respondía ante equivocaciones o comentarios inoportunos. Pero su fondo noble le hacían también reconocer cuando se había equivocado y suavizar su reacción un día después».

Otro de sus discípulos, el Doctor Ángel Ramos Núñez, Profesor Titular de Botánica en la Universidad Complutense, decía en un artículo necrológico que «...quienes tuvimos la suerte de compartir con él otras situaciones, además de las estrictamente laborales, sabemos que, por supuesto, era una persona como las demás: tan apasionado con sus amigos como contra sus enemigos; generoso en favores y exigente en lealtades; un hombre de su época que, con escepticismo, trató de comprender la actual» y decía más adelante que «...supo olvidar cualquier revés de la vida [...] con tal de no rehuir ninguna de las oportunidades y responsabilidades que se le presentaron; y si éstas no llegaban, iba en su búsqueda. Creo que, ante todo, fue un luchador». Y terminaba diciendo que: «el motivo de su vida, su amor propio, fue su familia: su mujer y sus seis hijos; su debilidad, sus nietos, a quienes adoraba».

Hecho público mi agradecimiento, paso a glosar su figura como profesor universitario.

EMILIO FERNÁNDEZ-GALIANO, PROFESOR UNIVERSITARIO

Emilio Fernández-Galiano Fernández (Barcelona, 3 de agosto de 1923 - Guadalajara, 5 de junio de 2006), licenciado en Farmacia (1945) y licenciado en Ciencias Naturales (1952) por la Universidad Complutense, se doctoró con premio extraordinario en Farmacia en 1950 bajo la dirección del profesor Salvador Rivas Goday —cuya vacante (Medalla núm. 26) en esta Real Academia ocupó él mismo— completando su formación en Canadá, en la Universidad de Quebec, bajo la dirección del profesor Pierre Dansereau en condición de Attaché de Recherche (1955-1956). De vuelta a Madrid continuó su carrera investigadora en el Instituto de Edafología y Biología Vegetal y después en el Instituto Botánico Antonio José Cavanilles, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, del que fue Colaborador Científico, Investigador (1962) y Profesor de Investigación (1965),

compatibilizando su posición en el CSIC con tareas docentes en la Facultad de Farmacia primero y en la de Biología después. De su paso por el CSIC ya nos ha hablado en su intervención anterior el Doctor Gonzalo Giménez Martín. Por otro lado, su faceta como investigador botánico ha sido ya tratada por el profesor Jesús Izco Sevillano. A mí me corresponde en este acto glosar su actividad docente universitaria que transcurrió entre Madrid y Sevilla, en viaje de ida y vuelta.

Como es lógico, la carrera docente universitaria del profesor Fernández-Galiano se inició en la Universidad Complutense de Madrid, primero en la Facultad de Farmacia y luego en la Sección de Biológicas de la Facultad de Ciencias. Durante los primeros años de formación (1946-1962) desarrolló su actividad docente en la Facultad de Farmacia, alternando la enseñanza de la Botánica y la Edafología, primero como Ayudante de Clases Prácticas y luego como Profesor Adjunto en la Cátedra de Geología Aplicada que ostentaba José M.^a Albareda. Pero fue en el ámbito de la Biología donde desarrolló y completó su carrera como profesor universitario, como pasaré a describir a continuación.

El 11 de agosto de 1953, la Licenciatura en Ciencias Naturales del entonces vigente plan de estudios universitarios se desdobló en dos licenciaturas: la de Ciencias Geológicas y la de Ciencias Biológicas, quedando adscrita a esta última la Cátedra de Botánica como era lógico. De ella dependían las asignaturas de Fanerogamia en el segundo curso de la licenciatura y la Criptogamia en tercero, más una asignatura optativa en quinto curso. En aquella época destacaba la figura de don Manuel Jordán de Urríes como responsable de la enseñanza de la Botánica, que solamente estuvo en posesión de la Cátedra de Fitografía desde 1959 hasta 1962 debido a su prematura muerte. Por entonces, Emilio Fernández-Galiano, que era Secretario del Instituto Botánico A. J. Cavanilles del CSIC, había sido nombrado Profesor Adjunto con carácter interino de la asignatura Fitografía y Geografía Botánica con efectos de 30 de marzo de 1962. Debido al fallecimiento de don Manuel Jordán de Urríes en 1962, Emilio Fernández-Galiano se hizo cargo de la docencia botánica como Encargado de Cátedra provisional de Fitografía (Criptogamia y Fanerogamia) durante los cursos 1962-1963 y 1963-1964, hasta que en enero de 1964 tomó posesión de la Cátedra de Fitografía, ganada por oposición, el profesor Francisco

Bellot Rodríguez, que había sido hasta entonces Catedrático de Botánica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago. El Profesor Bellot fue también, desde 1967, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

La enseñanza de la Botánica en la antigua Universidad de Madrid estuvo vinculada al Real Jardín Botánico en cuyas instalaciones del Paseo del Prado se llevaba a cabo la docencia, al menos desde 1857. Era costumbre entonces que el catedrático de Fitografía o Botánica Descriptiva de la Facultad de Ciencias fuera nombrado a su vez Director del Real Jardín Botánico. Sin embargo, a partir de 1967 se inició el traslado físico de la Cátedra de Fitografía a locales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense en la Ciudad Universitaria. Por aquella época se creó la figura del Profesor Agregado, siendo Juan Antonio Seoane el primer Profesor Agregado del Departamento de Botánica desde 1968 a 1971 hasta que marchó a Barcelona al obtener la Cátedra de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Barcelona, siendo sustituido el mismo año de 1971 por el Profesor Jesús Izco Sevillano, que hoy nos honra con su presencia en este acto en el que ha glosado la figura de Emilio Fernández-Galiano como botánico. El profesor Izco también abandonó el Departamento de Madrid al acceder a la Cátedra de Botánica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Como he señalado anteriormente, la carrera de Emilio Fernández-Galiano como profesor universitario está vinculada a la Universidad de Sevilla, puesto que la primera cátedra que se dotó en la Sección de Biología de la Facultad de Ciencias fue la de Botánica y él la ganó por oposición, tomando posesión de la misma el 11 de noviembre de 1965. Con él llegó a Sevilla Jesús Novo, que ocupó durante dos años la plaza de Profesor Adjunto y poco después, en 1967, se incorporó Benito Valdés Castrillón, que es en la actualidad Catedrático de Botánica de la Facultad de Biología, y en 1968 se incorporó al grupo Santiago Silvestre Domingo que en la actualidad ostenta el cargo de Catedrático de Botánica en la Facultad de Farmacia de Sevilla. No hay duda que Emilio Fernández-Galiano sembró la semilla que germinó en la Universidad Hispalense, dando numerosos frutos, como enumeraba el profesor Valdés en su artículo sobre «La Biología en la Universidad de Sevilla» escrita con ocasión del Quinto Centenario.

El Profesor Fernández-Galiano no solamente organizó el Departamento de Botánica en la Universidad de Sevilla, sino que también fue Decano de la Facultad de Ciencias desde 1969 hasta 1972, facilitando desde su puesto de Decano la incorporación de nuevos profesores que contribuyeron a la puesta en marcha de la Sección de Biología de dicha universidad. Además, como señala el profesor Valdés, del núcleo de la Facultad de Biología derivaron algunos de los grupos que se ocupan del desarrollo de la docencia y la investigación de las materias de mayor contenido biológico en la Facultad de Farmacia que se creó en 1973. El profesor Fernández-Galiano actuó también desde 1974 a 1976 como primer decano de la recién creada Facultad de Farmacia, siendo nombrado posteriormente Decano Honorario. Su capacidad organizativa académica se plasmó también como Director del Colegio Universitario de Cádiz (1972-1974) y del Colegio Universitario de Córdoba (1972-1974), que fueron las semillas que fructificaron más tarde en las actuales Facultades de Biología de las Universidades de Cádiz y de Córdoba. De su etapa sevillana hay que indicar también que participó en la fundación a partir de 1971 de la revista botánica *Lagascalia*.

En 1976, Emilio Fernández-Galiano regresó a Madrid al ser nombrado por concurso de traslado Catedrático de Botánica de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, tomando posesión el 8 de septiembre de 1976. Fernández-Galiano ocupó la Cátedra que había dejado vacante nuestro compañero en esta Real Academia, el Profesor Salvador Rivas Martínez quien, habiendo sido Catedrático de Botánica en la Facultad de Farmacia en la Universidad de Barcelona desde 1965 a 1970, volvió a la Universidad Complutense ocupando la Cátedra de Botánica de la Facultad de Biología desde 1970 a 1976 en que pasó a ocupar la Cátedra en la Facultad de Farmacia de la misma Universidad.

Con el Profesor Fernández-Galiano se trasladaron a Madrid en 1976 dos profesores contratados colaboradores suyos: Eugenio Domínguez Vilches —que había sido alumno de la primera promoción de Sevilla y que al año siguiente se marchó de Madrid al ganar una plaza por oposición, siendo en la actualidad Catedrático de Botánica en la Universidad de Córdoba y Rector de la misma—, y el anteriormente citado Ángel Ramos Núñez, actualmente Profesor Titular en el Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Biología de la

Universidad Complutense. Aprovecho esta mención para agradecer al profesor Ramos la información personal que me ha dado y que como discípulo de excepción recoge en el artículo *in memoriam* publicado la revista *Botánica Complutensis* editada en el propio Departamento. Ya en Madrid, el profesor Fernández-Galiano tuvo otros discípulos a quienes dirigió la tesis doctoral y que más tarde fueron también Profesores Titulares en el mismo Departamento, como son Margarita Moreno Sanz y Ana Buades Rodríguez. También hay que mencionar a Mercedes Alsina, que se fue de Madrid para ocupar una plaza como profesora de Instituto de Enseñanza Secundaria.

En 1983, el profesor Fernández-Galiano pasó a ocupar la Cátedra de Fitografía en la misma Facultad de Biología de la Universidad Complutense, ostentándola hasta el día 3 de agosto de 1988 en que le llegó su jubilación prematura a los sesenta y cinco años de edad por razones, a mi juicio, de una equivocada política ministerial del Gobierno de entonces. No obstante, continuó vinculado a la Universidad Complutense como Profesor Emérito desde el 10 de noviembre de 1988 hasta el 30 de septiembre de 1995.

Como Catedrático de Botánica de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense desempeñó además otros cargos académicos como el de Coordinador del Colegio Universitario Integrado «Arcos de Jalón» (1980-1981) y Director del Departamento de Botánica desde 1981 hasta 1988. La denominación del Departamento pasó de llamarse de «Botánica» a «Botánica y Fisiología Vegetal» y, finalmente, «Biología Vegetal I» (el de «Biología Vegetal II» corresponde a la Facultad de Farmacia). Siendo Director del Departamento, le correspondió figurar como primer Director de la Revista *Botánica Complutensis* que fue la continuación de los *Trabajos del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal* cuya publicación se había iniciado en 1968.

Dentro de la Universidad Complutense tuvo también otros cargos de responsabilidad como el de Delegado del Rector para la coordinación de la elaboración de un Proyecto de Jardín Botánico de la Universidad Complutense (1982) y el de Director del Instituto Universitario de Ciencias Ambientales.

Como méritos adicionales a su trayectoria académica hay que mencionar que fue Director en funciones del Real Jardín Botánico de

Madrid (desde el fallecimiento del anterior Director don Manuel Jordán de Urríes hasta su traslado a Sevilla), Vocal del Patronato del Parque Nacional de Doñana (1970-1975), Presidente del Comité Nacional Español del Programa MAB (El Hombre y la Biosfera) de la UNESCO, Vocal del Comité Español de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas, Vocal del Real Patronato de la Biblioteca Nacional, Asesor de Relaciones Internacionales del CSIC (1963-1965), Consejero de Número del CSIC (1968), Presidente de la Comisión Rectora del Instituto Nacional del Medio Ambiente del CSIC (1977-1980), Presidente de la Real Sociedad Española de Historia Natural (1982-1983). En 2002 se le concedió la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio.

Como hizo notar en su necrológica su discípulo el Profesor Ángel Ramos Núñez, Emilio Fernández-Galiano, que tanto se había preocupado por el medio ambiente en su vida profesional académica, falleció el 5 de junio de 2006, Día Mundial del Medio Ambiente. Descanse en paz nuestro compañero Emilio Fernández-Galiano Fernández.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GALLARDO, T. (2007): Notas para una historia de la Botánica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense. En (M. D. Ochando y A. Baratas (eds.): «Memorias de bata y bota. 50 promociones de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid», *Servicio de Publicaciones, Universidad Complutense de Madrid*, pp. 95-108.
- (2) RAMOS, A. (2006): En memoria. Profesor Emilio Fernández-Galiano Fernández. *Botanica Complutensis*, 30: 191-195.
- (3) VALDÉS, B. (1992): La Biología en la Universidad de Sevilla. *Conmemoración del Quinto Centenario, Sevilla*, pp. 311.

IN MEMORIAM

Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano (1923-2006)

JUAN MANUEL REOL TEJADA
Académico de Número

Cuando la Academia hace una sesión necrológica, no sólo ofrece un homenaje al compañero que nos ha dejado, sino que efectúa, también, una reflexión sobre sí misma y la personalidad de sus miembros.

Hoy recordamos al Profesor Emilio Fernández-Galiano y yo debo subrayar su perfil académico.

Ingresa como Académico de Número el 27 de octubre de 1983. Su discurso se titula: «El estado de la ciencia botánica española». Le contesta don Salvador Rivas Martínez.

El discurso de Fernández-Galiano refleja perfectamente su personalidad. En primer lugar demostró su amplia altura científica, pues al hacer la historia de la botánica, en los dos últimos siglos, nos proyecta ésta en el escenario de las ciencias naturales, químicas y médicas. Junto a los botánicos Fernández-Galiano sitúa a los Hopkins, Funk, Koch, Morgan y Muller (la teoría cromosómica y de las mutaciones) Fleming, Chain, Warburg, Krebs, Watson y Crick... Fernández-Galiano demuestra la unidad de la ciencia, la interrelación de las diferentes disciplinas y, si se me permite la extrapolación, la riqueza del «mestizaje» al que conduce esa interrelación de conocimientos.

En segundo lugar, su discurso demuestra que a Fernández-Galiano no sólo le interesa la historia, sino que es capaz de contextualizar

la historia de la botánica en el marco social, cultural y económico de cada momento.

Por ejemplo, Fernández-Galiano describe perfectamente cómo en los tiempos ilustrados la Universidad se mantiene en posiciones inmovilistas a fuerza de guardar celosamente su autonomía frente al poder real, lo que explica la creación de instituciones nuevas: Academias, Escuelas de Ingenieros, Jardines Botánicos cuyo dinamismo influirá sobre las Universidades. El Profesor Fernández-Galiano cuenta cómo la gran empresa que supuso el CSIC no significó, paralelamente, la modernización de las Universidades y cómo los jóvenes científicos nutrieron los Institutos de nueva creación mientras la dotación para nuevas Facultades y Cátedras se estancaba. La Universidad, dice, languidecía hasta 1953. Fernández-Galiano cita, con gran agudeza, que la Microbiología entró en la Universidad a través de la Facultad de Farmacia, 86 años después de los trabajos de Pasteur y la Genética, 88 después de Mendel. Contrapone este retraso con el esfuerzo anticipador de J. M. Albareda que introduce la Edafología en los estudios universitarios, o con el progreso de la moderna ciencia botánica que engarza sus saberes con los aspectos ecológicos: sociología-botánica, botánica-ecológica... Este esfuerzo, especialmente desarrollado en la Facultad de Farmacia, supone una vuelta de investigadores del CSIC interesados, también, por «la apasionante labor de la docencia universitaria». Quiero señalar que quien manifiesta tener una visión tan clara de los sucesos históricos y su interpretación, decía que no le interesaba nada la historia.

En tercer lugar, el discurso de Fernández-Galiano pone de manifiesto a un hombre que expresa un patriotismo crítico. Recoge las palabras de M. Pelayo que se duele de que un país que ha dado grandes exploradores, botánicos, mineralogistas, navegantes... se encuentre en el siglo XIX, tras el fallecimiento de Cavanilles y el exilio de Lagasca, tan postrado: «Ya no enviamos expediciones de astrónomos y naturalistas para estudiar la flora de México, Perú o Nueva Granada. Ya no se crean parques de aclimatación zoológica como los de Orotava y San Lúcar de Barrameda. Ya no salen de entre nosotros químicos que descubran el platino, el tungsteno y el vanadio, ni matemáticos que creen nueva ciencia, como Lance y Betancourt. Ya no es estudio de moda el de la botánica como en tiempos de Carlos IV...»

El Profesor Fernández-Galiano, que se alegra del resurgir de la ciencia botánica en España desde los años cincuenta, sin embargo no puede por menos que señalar la cicatería presupuestaria con la Universidad, máxime «si se considera que en los medios biológicos viene imperando desde hace no poco tiempo un aldeano desprecio por las ciencias sistemáticas y una provinciana admiración por las disciplinas que utilizan ultracentrífugas».

La exégesis del discurso de Fernández-Galiano me lleva a subrayar, como dije antes, rasgos característicos de su personalidad: su visión omnicomprensiva de las ciencias, su interés por situar la aventura científica en su contexto social, cultural y económico, es decir, histórico, y su patriotismo crítico. A ello añadiré un factor más: su carácter. El Profesor Rivas Goday dijo de él: «de carácter vivo e irritable, pero al momento se difuminan sus enojos».

He querido partir de este análisis de su personalidad para subrayar que en su quehacer académico se pueden descubrir esos mismos rasgos, como señalaré a continuación. Emilio Fernández-Galiano participa de forma destacada, como protagonista, en dos hitos de la historia de la Academia. El primero la reunión de las Academias Europeas en Madrid en 1992, para conmemorar los 50 años del Instituto de España, presidido entonces por Miguel Artola, con una ponencia que desarrolló conjuntamente con Ángel Vian, aquel otro gran Académico.

La ponencia trataba sobre «Las relaciones internacionales entre las Academias Europeas y posible desarrollo». Proponían la creación de un Instituto de Academias Europeas. Sólo hacía seis años que España había ingresado en la CE y nuestro Académico ya soñaba con un proyecto europeo que no anulase las propias identidades, ya que la diversidad es una característica plenamente europea, seguramente fundamento y base de su creatividad.

Los autores, que ven al Instituto Europeo como un gran órgano para la consulta y las propuestas anticipatorias, se lamentan que en el Tratado de la U.E. no se haga referencia alguna a las instituciones académicas «cuando tantas y tan prestigiosas lucen en el ámbito cultural europeo».

El segundo hito académico que protagoniza Emilio Fernández-Galiano es la gestión y coordinación de las Jornadas Iberoamericana-

nas de 1996, que se celebran para conmemorar el 50 aniversario del ingreso de nuestra Academia en el Instituto de España en 1946. Es una delicia leer sus cartas a ministros, embajadores, banqueros de alta alcurnia, científicos... y observar cómo explica el sentido de las Jornadas y su objetivo: revisar el panorama científico de esa hora, los desafíos sanitarios (el sida, las enfermedades parasitarias, la mejora de la salud pública) y a la vez mostrar la calidad de los científicos de las Academias farmacéuticas y de los cultivadores de estas ciencias.

Fernández-Galiano puso trabajo, inteligencia e ilusión. Esta receta fue determinante para el éxito de las Jornadas. En estos ejemplos, insisto, se percibe como aquél entiende el carácter universal de la ciencia, su influencia en la historia y su interés por el papel de España.

Traté bastante a Fernández-Galiano. Vi su compromiso con la Academia y percibí su esfuerzo por incorporar a los mejores. Citaré sólo a dos compañeros cuyo ingreso es, en gran parte, iniciativa suya: el Profesor Espinós y el Profesor Lacadena.

Le vi actuar en las Juntas de Gobierno: siempre interesado, demostrando su profundo conocimiento de la Academia y sus características, firme en sus convicciones, sabedor del peso de su opinión, dialéctico duro, nunca descortés. Recuerdo con emoción como después de una viva discusión sobre un tema académico, me dijo: «una cosa me tranquiliza totalmente, que tú llevas ese tema». Era yo entonces vicepresidente.

Casi simultáneamente a mi elección como Presidente, Emilio Fernández-Galiano sufrió su primer problema, grave, de salud. Nunca se recuperó, aunque una vez asistió a una reunión en la Academia.

En los primeros tiempos le visité con cierta frecuencia. Me enseñaba los textos que recogían sus puntos de vista o sus trabajos de investigación botánica. Hablábamos de todo. Leía todos los asuntos relacionados con la Academia. Poco a poco sus facultades mermban. Producía desasosiego ver a un hombre de su actividad anterior postrado en una silla, con sus ojos negándose a leer.

De esta época guardo dos ejemplos de comportamiento excepcional, de abnegación y amistad. Carmen, su mujer, su compañera de toda la vida, poniendo serenidad y sacrificio a estos últimos difíciles

años. Nuestro compañero Manuel Ortega Mata, el amigo de toda la aventura universitaria, que le visitaba todos los sábados. Ejemplo impresionante de amistad.

Siempre he dicho que la muerte debe integrarse en la vida, que la muerte se doblega ante la vida que trasciende su propia finitud. Debo reconocer, sin embargo, que me perturba y me conmueve el espectáculo de la muerte rondando durante meses a un hombre que espera.

Me digo que Pedro Laín distinguió perfectamente entre la espera y la esperanza. Emilio Fernández-Galiano era cristiano y tenía esperanza. Tenía su carácter y el derecho a interpelar e interpelarse. Emilio vivió los últimos años en Guadalajara junto a Carmen, tenía y sentía el amor de sus hijos, pero estaba lejos de su casa, de sus libros y de sus amigos.

Estoy seguro que en aquellos momentos Emilio Fernández-Galiano recordaba los versos de su tío andaluz Manuel Fernández Gordillo. Porque el universitario y gran botánico, de dialéctica acerada y corazón limpio, tenía una fina, aunque soterrada sensibilidad. En una ocasión me regaló dos libros de su tío Manuel: «Canciones de la Jornada» y «Canción de los fuegos» (1918, 1926). Este último empieza así:

«El fuego está en las almas febriles, anhelantes
—amores y dolores de vida mundanal—
son llamas de la tierra sus luces vigilantes,
que buscan paradero soñando lo inmortal».

El alma ardiente del gran botánico, abierta a la esperanza, alcanzó un día la inmortalidad que soñaba.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

12 de abril

A las 19 horas, toma de Posesión como Académico Correspondiente del Doctor Don Guillermo Sáez Tormo, quien pronunció su conferencia titulada: «Radicales libres y estrés oxidativo. Bases bioquímico-moleculares e implicaciones fisiopatológicas». La presentación corrió a cargo de la Excma. Señora Doña Ana M.^a Pascual-Leone Pascual.

19 de abril

A las 17,30 horas, Ciclo de Tertulias sobre «Cambio climático». Coordinador y presentador del Ciclo: Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez Fernández. Conferenciante: Excmo. Señor Don Antonio L. Doadrio Villarejo: «Cambio climático, realidad o mito».

19 de abril

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente en Francia, el Doctor Bernard Portha, con su discurso: «From Pathogenesis to Therapeutic of Type 2 Diabetes. The GK Rat Paradigm». Fue presentado por la Excma. Señora Doña Ana M.^a Pascual-Leone Pascual.

26 de abril

Conferencia del Doctor Don José Manuel Giménez Amaya, Académico Correspondiente, titulada: «Interneuronas estriales: Un punto crucial en la comunicación corticosubcortical».

3 de mayo

A las 17,30 horas, Ciclo de Tertulias sobre «Cambio climático». Coordinador y presentador del Ciclo: Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez Fernández. Conferenciante: Doctor Rogelio López Vélez:

«Posibles enfermedades víricas transmitidas por artrópodos, consecuencia del cambio climático».

3 de mayo

A las 19 horas tomó posesión como Académico Correspondiente en Dinamarca el Profesor Doctor Ulf Simonsen, con la lectura de su discurso: «Función de las células endoteliales en la vasodilatación mediada por óxido nítrico y enfermedad cardiovascular».

10 de mayo

A las 17,30 horas, Ciclo de Tertulias sobre «Cambio climático». Coordinador y presentador del Ciclo: Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez Fernández. Conferenciante: Doctor Daniel Sánchez Mata: «Repercusiones del cambio climático sobre la flora de España».

10 de mayo

A las 19 horas, presentación del «Diccionario terminológico de las Ciencias Farmacéuticas». Con la intervención del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia; el Ilmo. Señor Don Javier Puerto Sarmiento, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid: «Los diccionarios de farmacia: Ciencia y cultura»; el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Catedrático de la Universidad de Salamanca: «Los límites de las ciencias farmacéuticas», y el Ilmo. Señor Don Enrique Alcaraz Varó, Catedrático de la Universidad de Alicante: «Aspectos del lenguaje de la farmacia». Cerró el acto la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excma. Señora Doña M.^a Teresa Miras Portugal.

17 de mayo

A las 17,30 horas, Ciclo de Tertulias sobre «Cambio climático». Conferenciante: Doctor Antonio R. Martínez Fernández: «Cambio climático y paludismo: Pasado, presente y futuro».

17 de mayo

A las 19 horas, conferencia del Excmo. Señor Don Guillermo Tena Núñez, Académico de Número, titulada: «La farmacia y el arte».

24 de mayo

A las 17,30 horas, Ciclo de Tertulias sobre «Cambio climático». Coordinador y presentador del Ciclo: Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez Fernández. Conferenciante: Doctor Gaspar González González: «Cambio climático y agricultura. Catástrofe, adaptación».

24 de mayo

A las 19 horas, conferencia del Doctor Don Jesús Vaquero Crespo, Catedrático de Neurocirugía de la Universidad Autónoma de Madrid, titulada: «Terapia celular en la paraplejía traumática».

31 de mayo

A las 19 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente en México del Profesor Doctor Roberto Medina Santillán, quien pronunció su conferencia titulada: «Aplicación de la farmacocinética para mejorar la eficacia terapéutica». La presentación corrió a cargo de la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto.

14 de junio

Mesa redonda de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de Valdelateja. Ponentes: Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé, «Historia y generalidades del Balneario». Profesor Doctor Don Miguel Ladero Álvarez, «Estudio sobre la vegetación del entorno del Balneario». Doctor Don Antonio Ramírez Ortega y Doctor Don Ignacio Pinuaga Espejel, «Estudio hidrogeológico de las aguas del Balneario».

Sesión Científica Especial

Presentación del Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas



Mesa de la Presidencia (de izquierda a derecha): Don Enrique Alcaraz Varó, Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Don Alberto Galindo Tixaire, Doña María Teresa Miras Portugal, Don Juan Manuel Reol Tejada y Don Javier Puerto Sarmiento.

El pasado 10 de mayo tuvo lugar la presentación del «Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas», acto presidido por la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excm.a. Señora Doña María Teresa Miras Portugal. La Señora Presidenta agradeció la presencia del Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, así como de las Excmas. y Excmos. Señores Académicos. En su discurso de presentación, la Doctora Miras Portugal realzó la importancia del acto al indicar que «estamos asistiendo a una sesión

histórica, que es la presentación del Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas en su versión bilingüe español/inglés. Esta obra, como todas las grandes obras, ha necesitado un largo tiempo para su culminación, requiriendo intenso trabajo y ayuda económica, agradeciendo el trabajo intenso de nuestro académico Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Catedrático de Farmacia de la Universidad de Salamanca, de Don Enrique Alcaraz Varó, Catedrático de la Universidad de Alicante, la Doctora Raquel Martínez Motos y de Don José Luis Castillejo de la Editorial Ariel». Señala que «las grandes obras, como las grandes catedrales, nunca se podían culminar en el mandato de un único obispo y en este caso es necesario destacar la ilusión, empeño y esfuerzo de mi antecesor en el cargo, el anterior Presidente Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, ya que el gran trabajo se realizó fundamentalmente durante su mandato».

Seguidamente, la Doctora Miras Portugal dio paso a los discursos del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia; el Ilmo. Señor Don Javier Puerto Sarmiento, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid: «Los diccionarios de farmacia: Ciencia y cultura»; el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Catedrático de la Universidad de Salamanca: «Los límites de las ciencias farmacéuticas», y el Ilmo. Señor Don Enrique Alcaraz Varó, Catedrático de la Universidad de Alicante: «Aspectos del lenguaje de la farmacia», cuyos textos se incluyen a continuación.

Cerró el acto la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, quien agradeció a todos los que participaron en el acto, en la elaboración del diccionario y su financiación, destacando la gran ayuda recibida de la Fundación José Casares Gil. En su discurso de clausura, la Doctora Miras Portugal hizo una breve reseña de la aparición del diccionario en la historia. Así, indicó que «parece ser que el primer diccionario surge de un sobrino de Platón, al que su tío le pidió que recogiera los términos conocidos, que luego sería más fácil para enseñar. Y son los griegos, cuando son dominados por los romanos, cuando hacen su primer diccionario aleatorio, con términos para saber qué significaban algunas palabras que aparecían en los maravillosos textos de Homero». También comentó que: «Nosotros damos por sentado que un diccionario va en orden alfa-

bético. Pero el orden alfabético no aparece hasta el año 1100, con el Suda o Suida, que es la primera vez».

Por último, la Señora Presidenta añadió que «nuestro objetivo, como Academia, es seguir enriqueciendo este diccionario, que florezca, y seguir pidiendo ayuda a todos y cada uno de los grandes científicos e historiadores que tenemos. Y a los grandes lingüistas y a las editoriales, porque sin ellas tan poco podríamos hacer. Y, por supuesto, a los patrocinadores».

Presentación del Diccionario Bilingüe de Términos Farmacéuticos

JUAN MANUEL REOL TEJADA
Académico de Número

Quiero agradecer muy sinceramente a nuestra Presidenta la sensibilidad mostrada al proponerme hacer la introducción de esta sesión en la que se presenta el Diccionario Bilingüe de Términos Farmacéuticos. Ciertamente puse especial interés en promover y culminar este proyecto que no dudó en llamar el proyecto estrella de la Fundación José Casares Gil.

Leeré algunos párrafos que en junio de 2006 preparé para el prólogo.

El Diccionario: modernidad y tradición

Las Academias son tradición y modernidad. He aquí un primer motivo, exigido por la modernidad, por el que la Real Academia Nacional de Farmacia se decidió, a partir del año 2001, a acometer la tarea de elaborar un «Diccionario de Términos Farmacéuticos español-inglés e inglés-español».

Pero había otra exigencia que venía de nuestra tradición. Suelo decir que nuestro más preclaro antecedente académico se remonta a 1737, año en el que Felipe V aprobó por Real Pragmática los Estatutos del Real Colegio de Profesores Boticarios de Madrid. Pues bien, ese Real Colegio, entreverado de multitud de rasgos y hábitos académicos, jalona su historia con hitos científicos tan singulares como la Farmacopea Matritense, en cuya segunda edición de 1762 puso tanto empeño Don José Hortega, en cuya farmacia nació la Real Academia de Medicina de la que aquél fue Secretario Perpetuo. Pero en este caso debemos fijarnos precisamente en los diccionarios. En 1798 y luego en 1803, nuestro compañero Manuel Hernández de Gregorio publica las dos ediciones de su Diccionario de Farmacia, obra de consulta en el ámbito farmacéutico, plena de rigor y de suma utilidad. Más tarde, en 1826, el Colegio edita la «Sinonimia

Farmacéutica», de Manuel Jiménez, texto al que pueden dedicarse los mismos elogiosos comentarios que al Diccionario anterior.

Sin embargo hoy, y para este Prólogo, quiero fijarme en el «Diccionario de Farmacia del Colegio de Farmacéuticos de Madrid» (1860), magnífica obra que en dos gruesos tomos recoge todo el saber farmacéutico de su tiempo y que pone de manifiesto el esfuerzo colectivo y el liderazgo de unos hombres en un momento difícil de la Historia de España.

La historia del «Diccionario de Farmacia del Real Colegio de Farmacéuticos» (1860)

Merece la pena leer la introducción de este Diccionario (que se custodia en nuestra Biblioteca) porque vamos a encontrar un curioso paralelismo con lo que han sido los criterios y vicisitudes de la elaboración del texto que presentamos.

En 1856 el Presidente del Real Colegio, Manuel Rioz y Pedraja, propone a sus compañeros de Corporación el compromiso de elaborar un Diccionario de Farmacia. Reto que asume la Sección Científica (indudable rasgo académico del Colegio) y la Junta General. La Sección Científica hace un repertorio de instrucciones para definir las voces y señala ocho áreas o secciones de estudio que incluyen, por ejemplo: «Materia farmacéutica, partes y productos de plantas», «Farmacia químico-orgánica», «Compuestos galénicos», «Física de aplicación, vasos, utensilios y aparatos farmacéuticos»...

Abre las secciones a la colaboración de todos los «individuos» del Real Colegio para que ellos elijan de acuerdo con sus conocimientos. El método no daba, sin embargo, los resultados esperados y hacía interminable la colección de voces y definiciones. En 1859 se dio un giro al sistema, un golpe de timón, en tanto que se propuso acabar el proyecto, «dando a la imprenta los materiales ya reunidos». La Junta, sin embargo, no quiere arriesgar los caudales del Real Colegio «porque sabe que otros libros importantes no se venden» y propone que, «sin perder la propiedad de la obra», sea una empresa, «El Restaurador Farmacéutico», quien publique la obra a su cargo. El Real Colegio nombra dos «individuos inspectores» para controlar, aprobar y revisar la obra. Por cierto, «El Restaurador Farmacéutico»

había sido fundado por aquel gran farmacéutico y político liberal que se llamó Pedro Calvo Asensio.

La historia de este diccionario bilingüe

La Real Academia Nacional de Farmacia ha seguido un camino distinto, porque distintos son los tiempos.

Hace años me inspiré en un proyecto de Diccionario de la Academia de Farmacia de Francia —hacia el año 1997— y propuse un proyecto similar en los primeros tiempos de la Fundación José Caesares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Más tarde, siendo yo Presidente de esta Corporación y de la Fundación, nuestro Académico de Número, Profesor Doctor Domínguez-Gil Hurlé, Patrono de la Fundación, planteó este proyecto pero en términos de diccionario bilingüe. El Patronato acogió favorablemente la idea y se trasladó a la Real Academia Nacional de Farmacia un esquema de trabajo que permitía involucrar a los Académicos en la elaboración y control, pero responsabilizando al Profesor Domínguez-Gil de la gestión del proyecto. Como estábamos ante un diccionario bilingüe, el Profesor Domínguez-Gil entendió, y así fue aprobado, que debíamos contar con un experto en el doble campo del conocimiento lingüista y la experiencia en la elaboración de diccionarios bilingües. A tal efecto, el Profesor Alcaraz de la Universidad de Alicante fue designado co-responsable del proyecto.

Los académicos discutieron éste y la metodología en Junta General. El Profesor Domínguez-Gil y el Profesor Alcaraz desarrollaron sesiones monográficas sobre el diccionario. La Junta entendió que en el siglo XXI, y disponiendo de un sitio web (que hoy, 2007, tiene dos millones de visitas) era necesario ofrecer la oportunidad de sumarse al proyecto a todos aquellos cultivadores de las ciencias farmacéuticas que quisieran hacer aportaciones al diccionario.

Hay otro aspecto que quiero destacar por su similitud con el «Diccionario de Farmacia» de 1860. Al igual que nuestros antepasados pensamos que un proyecto de esta envergadura debía de tener una distribución profesionalizada. Por ello se ha llegado a un acuerdo con la Editorial Ariel para lograr la mejor distribución del texto.

El diccionario bilingüe: resultado y ofrecimiento

El Real Colegio en 1860 se preguntaba por la utilidad del «libro» y respondía con énfasis afirmativo. He puesto libro entre comillas. Hay una explicación que tomo de George Steiner cuando dice que todo se lo debemos en filosofía a Atenas y en religión a Jerusalén. La Jerusalén judía que ha dado a la humanidad el monoteísmo, el diálogo con la trascendencia y un «libro». Todas las grandes ideas y los grandes proyectos terminan en un «libro». Pues bien, el esfuerzo de la Real Academia Nacional de Farmacia para ir al paso de la modernidad, establecer un diálogo universal de voces y significados farmacéuticos, facilitar la comunicación por la fiel equivalencia de éstos en dos lenguas, español e inglés, finaliza, se concreta, en un «libro»: en este diccionario.

Ese ha sido nuestro objetivo. Nos situamos así en una línea parecida a la de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales que elabora y publica un Diccionario de las Ciencias o de la Real Academia Nacional de Medicina, que además del Diccionario de términos médicos ha elaborado un magnífico «Diccionario crítico de dudas inglés-español de Medicina». Su Director Técnico, el Doctor Don Fernando Navarro, dice que «la normalización de los tecnicismos científicos en español es nuestra asignatura pendiente». Aunque desde distintas perspectivas las tres Academias científicas pretenden grandes y parecidos objetivos.

Es un gran honor y un privilegio para mí haber impulsado esta obra que debe ser un signo de modernidad y potencia de la Real Academia Nacional de Farmacia. Quiero agradecer su apoyo financiero a la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Especialmente quiero agradecer a los Presidentes de Sección y a todos los Académicos su aportación y esfuerzo colectivo. Igualmente a todos aquellos que han enviado observaciones y sugerencias a nuestro sitio web. De manera muy significativa quiero dar las gracias al Profesor Domínguez-Gil, Catedrático de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, maestro de muchos profesores universitarios, Jefe de uno de los más prestigiosos Servicios de Farmacia Hospitalaria de España: el del Hospital Clínico Universitario de aquella ciudad por su permanente dedicación, la Dirección Técnica del proyecto y el entusiasmo

puesto para alcanzar un objetivo de tan alto interés académico. Junto a él, mi gratitud al Profesor Alcaraz y su equipo que ha puesto en este proyecto su experiencia en lexicografía de dimensión bilingüe.

Una propuesta a las Academias de Farmacia iberoamericanas

Creo que el mensaje de cierre de este prólogo tiene un claro destinatario: las Academias de Farmacia iberoamericanas. En las sucesivas ediciones de este diccionario deberían participar aquellas Academias. El mundo académico iberoamericano podría ofrecer así a todos los hispanohablantes interesados un valioso instrumento de comunicación en Ciencias Farmacéuticas. La Comunidad Científica, Sanitaria y nuestras sociedades, sabrían de la pujanza, la utilidad y la modernidad de nuestras Academias.

En este mismo sentido me expresé en Buenos Aires, en noviembre de 2006, cuando recibí el título de Académico de Honor de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina y, asimismo, he propuesto —y la Presidenta y el Secretario han aceptado— que este ofrecimiento se materialice en la sesión de clausura del II Encuentro de Academias Iberoamericanas de Farmacia, y así consta en el Programa.

Gracias, otra vez, Señora Presidenta, por darme la oportunidad de hacer público el esfuerzo de la Fundación José Casares Gil que ha financiado el proyecto y por permitirme poner de manifiesto mi voluntad de llevarlo a cabo para honra de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Presentación del Diccionario de Farmacia. Los diccionarios de farmacia: ciencia y cultura

JAVIER PUERTO

Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid

Excma. Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Ciencias.

Excmas. Señoras Académicas.

Excmos. Señores Académicos.

Señoras y Señores:

En primer lugar, quiero agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia y a mi ilustre amigo, el excelentísimo académico Alfonso Domínguez Gil Hurlé, la oportunidad que me brindan de acompañarle en el nacimiento de este excelente y utilísimo fruto de su magín y de su esfuerzo.

Ciencia y palabra

La ciencia, sostiene la Real Academia Española a través de su *Diccionario*, es el conocimiento cierto de las cosas por sus principios y causas.

La definición prioriza el afán de los científicos en la búsqueda de la auténtica sabiduría; el deseo de comprender los orígenes de los fenómenos naturales y sus consecuencias.

En el camino hacia su verdad, el método científico se ha desarrollado, a lo largo de la Historia, en maneras cambiantes de observar lo real: el cosmos, la naturaleza terrenal y la condición humana en sus aspectos físicos e intelectuales. Una peculiar manera de observar que, como todas, sólo puede expresarse en palabras, tanto si se pretenden describir los resultados de los análisis efectuados, como si se intenta interpretarlos con el deseo de hacer predicciones.

En el principio de la Historia, hasta que se produjeron los primeros cambios paradigmáticos en las diferentes disciplinas científicas durante los siglos XVI y XVII, las verdades de las creencias predominaron sobre las de la razón.

El lenguaje fue el mismo para describir todos los aspectos, de la naturaleza y del espíritu, desde cualquier posición intelectual.

Al ir afinándose los métodos de observación, a partir del Renacimiento y del Barroco, la descripción de la realidad inmediata sensible se distanció de una más fina observación científica (lo infinitamente alejado, lo infinitamente pequeño).

Empezaron a surgir problemas entre ciencia y creencia y comenzó a producirse la brecha entre las mal llamadas dos culturas, profundizada durante el siglo XIX.

Surgió la terminología científica diseñada para poder nombrar realidades entonces desconocidas.

Hasta producirse la que ya nadie denomina «revolución científica», el lenguaje en el que se expresaban literatos, pensadores y científicos era el mismo.

A nadie se le ocurre mantener que Hornero o Hesíodo no fueron grandes poetas porque en su *Ilíada*, en la *Odisea*, en la *Teogonía* o en *Los trabajos y los días*, daban cuenta de los conocimientos científicos de su tiempo. Los críticos post-ilustrados motejaron de poetas de segunda fila a Arato de Solos (310-240 a.C.), Apolonio de Rodas (297 a.C.) o Nicandro de Colofón (siglo II a.C.), autores de textos con tema astrológico o farmacológico, pero no se atrevieron a hacer lo mismo con Hipócrates de Cos (450-375 a.C.) un sanador, pero también un filósofo natural de la talla de Aristóteles o Platón, que ayudó a consolidar el pensamiento griego y, dentro de él, el concepto de naturaleza, con una calidad poética de primera magnitud. Tampoco se atrevieron a descalificar a Teofrasto, el botánico discípulo del estagirita ni a Tito Lucrecio Caro (94-50 a.C.), capaz de escribir su monumental *De rerum natura*, inspirado en la filosofía epicúrea y la *fisiología* atomista.

Durante el Renacimiento y el Barroco, con la obra de Copérnico o Galileo, la de Vesalio y la de Harvey, la ciencia empieza a adentrar-

se en territorios no evidentes, para los cuales hacen falta métodos especiales de observación. Se comienza a mirar a lo infinitamente alejado, mediante el telescopio; lo infinitamente pequeño, a través del microscopio o lo vedado por la creencia o los prejuicios, como el interior del cuerpo humano.

Empieza a ser necesario un nuevo vocabulario astronómico, anatómico o fisiológico y los humanistas tradicionales —amantes de las letras clásicas— o nuevos al estilo de Terencio —*«hombre soy y nada humano puede serme ajeno»*— encuentran tremendas dificultades para reconocer que todo —hasta su forma de pensar, sentir o creer— está siendo afectado por la nueva visión del macrocosmos y del microcosmos aportada por la ciencia.

Durante la Ilustración se produce la crisis definitiva, no tanto por las quiebras paradigmáticas producidas por Linneo o Lavoisier en el campo de la botánica o de la química, como por la postura tomada por los enciclopedistas, D'Alambert, Diderot o el filósofo Voltaire, a favor de la ciencia, utilizada por una parte como arma arrojada contra la creencia y, por otra, capaz de constituirse en un elemento político de primera magnitud, primero para los déspotas ilustrados y luego para los burgueses liberales, partidarios de la Revolución Francesa.

Es en este contexto ilustrado cuando empezamos a encontrarnos con una preocupación explícita por la nomenclatura científica y con los nuevos diccionarios enciclopédicos.

Linneo establece la suya, binaria, para clasificar a los animales y plantas. Lavoisier, Guyton de Morveau, Berthollet y Fourcroy, la de la nueva química.

Nuevos conocimientos científicos, nuevos hechos, nuevas palabras.

Lavoisier lo explica con claridad meridiana:

«Las lenguas no sólo tienen por objeto, como se cree comúnmente, expresar por signos las ideas y las imágenes; sino que además son verdaderos métodos analíticos, con cuyo auxilio procedemos de lo conocido a lo desconocido...»

Más adelante escribe:

«Si las lenguas son los verdaderos instrumentos que se han formado los hombres para facilitar las operaciones de su espíritu, importa que estos instrumentos sean los mejores que fuere posible, y esto es trabajar a la verdad sobre el adelantamiento de las ciencias, más que procurar su perfección».

Durante el siglo XIX se sigue profundizando en el conocimiento de la naturaleza y se accede a territorios hasta entonces vedados. La microbiología permite dominar algunas enfermedades. La farmacología convierte la terapéutica de empírica en pre científica y el positivismo establece el espejismo platónico de un avance científico indefinido, permanentemente favorable al desarrollo humano, junto a la prioridad de la ciencia sobre cualquier otro modo de conocimiento.

Esta ilusoria prepotencia llevó a algunos historiadores alemanes a proclamar incompatibles sus estudios con los históricos científicos, con lo cual las añejas dificultades de la interpretación científica con respecto a las creencias, se vieron reforzadas ahora en el ámbito de las humanidades, conformándose las «dos culturas» como enemigas aparentemente irreconciliables.

Farmacia: Ciencia y Tecnología

A nuestra profesión suelen definirla como científica y especializada en los medicamentos. Desde hace años prefiero explicarla desde la vertiente sanitaria: ocupada en la conservación y restauración de la vida y en la prevención de la enfermedad en los seres humanos, los animales y las plantas, desde su conocimiento especializado del medicamento. Así, el foco de interés pasa del objeto —el medicamento— al sujeto —principalmente los humanos y el resto de los seres vivos— se explicita su hipocrático compromiso con la vida, se entiende nuestra amplia preparación, pues ha de buscarse el medicamento allá en donde se encuentre y se ha de conocer su uso, y sigue situándose el fármaco en el centro de nuestras inquietudes, como principal palanca de actuación científica, técnica y profesional.

La Farmacia no es una ciencia, más bien un arte científico, como la definía ya la Real Cédula de 1650. Ese arte se desarrolla a través de un cúmulo amplísimo de conocimientos científicos, relacionados con la naturaleza y con el ser humano, dotado cada uno de su propia jerga específica, de su particular nomenclatura hermética a ojos de la mayor parte de los ciudadanos. Esos conocimientos desembocan en un estudio profundo de la farmacología y todos confluyen en un saber no científico, sino tecnológico, la antiguamente llamada Farmacia Galénica, dedicada al conocimiento íntimo del fármaco y de su preparación, que es lo nuclear, el fundamento diferencial de nuestra actividad profesional y el que hace imprescindible nuestra función social.

Para entendernos y hacernos entender, en ese desarrollo profesional hemos de utilizar multitud de lenguajes científicos procedentes de la química, la botánica, la microbiología, la parasitología, la fisiología humana o la anatomía, entre otros, más uno específicamente tecnológico configurado por la tecnología farmacéutica.

Entre nosotros no ha sido fácil nunca hacernos entender por quienes carecían de formación científico-tecnológica, acaso, al igual que los médicos, tampoco lo hemos intentado con demasiado ardor.

Por eso, ya desde 1865, el antiguo *Colegio de Farmacéuticos de Madrid*, institución intermedia entre lo administrativo y lo científico, creada a principios del siglo XVIII con esas dos misiones y considerada antecedente tanto del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, aunque más propiamente lo sería del Consejo General, pues aceptaba en su seno a farmacéuticos de todo el Estado, y también de la Real Academia Nacional de Farmacia, en la cual se transformó en 1932 al haberlo dejado sin función la colegiación obligatoria de 1917, propició la redacción de un magnífico e injustamente olvidado *Diccionario de Farmacia*.

En el mismo, en dos tomos, se recogen todas las entradas necesarias para el ejercicio profesional, sin la intención de sustituir el magisterio científico, tecnológico y legal de la Farmacopea, sino como auxiliar a la labor profesional del farmacéutico.

En la actualidad es una de las mejores armas del historiador del medicamento por su ambición en recoger no sólo lo presente, sino

lo que había sido tradicional durante el ejercicio profesional a lo largo de los siglos.

Algunos años más tarde, en 1889, Mariano Pérez Mínguez publicó su *Enciclopedia farmacéutica* o *Diccionario General de Farmacia, teórico práctico*, en tres tomos.

Pasados ciento cuarenta y dos años aparece un nuevo *Diccionario de Farmacia* propiciado, ahora, por la Real Academia.

En la actualidad tenemos conciencia de la universalidad del método científico y tecnológico y sabemos de la implantación del inglés como lengua franca, de la misma manera que lo fue el latín de la Roma imperial o del catolicismo universal en la Europa Occidental cristiana.

Conocemos también la dificultad del lenguaje científico-tecnológico y la necesidad de dotar a nuestro idioma de un correcto léxico en este ámbito, si no queremos que se transforme en lengua de siervos, ayuna de los medios necesarios para acceder a los saberes científicos.

Tenemos conciencia de la necesidad de no hacer de nuestros conocimientos algo inaccesible, propio de una mítica torre de marfil pues, cada día más, los ciudadanos han de dotarse de una correcta formación sanitaria para convertirse en sujetos activos de su propia salud.

Un diccionario de farmacia, además bilingüe en español e inglés, cumple con esas tres premisas: permite normalizar el lenguaje científico-tecnológico empleado en la farmacia. Aspira a dotar a nuestro idioma de las armas necesarias para no retrasarse en el ámbito de nuestra competencia y se presenta como testimonio de nuestro nivel de desarrollo ante la comunidad científica internacional y en su propia lengua. Además, puede ser empleado por quien quiera tener una cultura universal en donde no estén olvidados o desterrados los elementos científicos y tecnológicos.

A mi parecer no se puede efectuar un trabajo más patriótico, más útil, ni más adecuado a los fines de una Real Academia. De ahí mi sincera alegría por su redacción, mi cordial felicitación a todos los hispanohablantes, a los farmacéuticos españoles y a quienes han

estado directamente implicados en el proyecto. En primer lugar los académicos de Farmacia, dentro de ellos, al menos dos directores: el Doctor Don Juan Manuel Reol, que tantas iniciativas de gran calado institucional propició durante su mandato, y la Profesora Doña María Teresa Miras, quien ve la publicación de tan interesante texto al poco de iniciarse el suyo y, de manera muy especial, al Profesor Alfonso Domínguez Gil Hurlé, al Profesor Enrique Alcaraz, la Profesora Raquel Martínez Motos y a todos cuantos les han ayudado en el empeño.

La Real Academia Española edita el utilísimo *Diccionario de la Lengua*, merced al trabajo de un Instituto de Filología excelentemente dotado en medios y personal.

La Real Academia de la Historia está en trámite de publicar el imprescindible *Diccionario Biográfico Español*, mediante un centro especial, creado en su seno, bien dotado y financiado.

Este diccionario ha sido posible gracias al esfuerzo de un académico singular con una poderosísima formación en farmacia galénica y farmacia hospitalaria y con una capacidad de trabajo inteligente digna de todo encomio. A él, al autor de la traducción y a sus colaboradores, no se les puede regatear felicitación alguna.

Permítanme finalizar con la fórmula tradicional adaptada a los tiempos:

He dicho. Muchas gracias por su atención.

Los límites de las ciencias farmacéuticas

ALFONSO DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ
Catedrático de la Universidad de Salamanca

Excma. Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

Excmo. Señor Presidente Saliente.

Excelentísimos Señoras y Señores Académicos.

Señoras y Señores:

La presentación de esta primera edición bilingüe del Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas ha sido un momento esperado, y pensamos que también importante para la Real Academia Nacional de Farmacia. Los autores de esta obra estamos satisfechos de haber podido dar una respuesta adecuada al encargo que recibimos, hace más de tres años, de la Junta de Gobierno de nuestra Corporación para realizar este Diccionario Terminológico. Somos conscientes de que la meta alcanzada es modesta, aunque consideramos que hemos dado el primer paso para que este diccionario se convierta, pronto, en una obra de referencia en el campo de las Ciencias de la Salud. Realizar este proyecto ha sido, sobre todo, una prueba de humildad para los autores ante la inmensidad del campo que se abría ante nuestros ojos y que, poco a poco, intentábamos desbrozar pese a que nunca parecía tener fin.

Ahora, finalizada la obra y tras este breve periodo de satisfacción personal, debemos planificar el futuro de este Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas de la Real Academia Nacional de Farmacia. Además, ya tenemos nuevos proyectos, entre ellos valorar el ofrecimiento para su traducción al francés, previo acuerdo con la Academia de Farmacia de Francia. Otro desafío importante es la distribución del diccionario en los Estados Unidos, para lo que contamos con el apoyo de diversas sociedades científicas y profesionales norteamericanas, entre ellas la American Society

of Health-System Pharmacists, la American Pharmaceutical Association y el American College of Clinical Pharmacy, que ya han valorado muy positivamente el proyecto y han destacado la oportunidad de su publicación por el auge del español en las organizaciones sanitarias de los Estados Unidos. Michael Cohen, Presidente del Institute for Safe Medication Practice, se ha ofrecido para informar a los lectores del Hospital Pharmacy sobre las características de la obra y contribuir a su difusión en los Estados Unidos y Canadá. La próxima celebración en Madrid del II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia representa una excelente oportunidad para difundir el diccionario en países que también hablan español. Sorprendentemente ya se ha recibido el primer pedido del diccionario: 50 ejemplares de Argentina, antes de que se haya iniciado la distribución, que será a partir del próximo martes. Como profesor de la Universidad de Salamanca, cuya vocación hispanoamericana es bien conocida, propondré al Excmo. Señor Rector que este diccionario sea incorporado a los programas de intercambio que nuestra Universidad mantiene con diversas universidades americanas.

Permítanme, a continuación, destacar los hechos más relevantes que se han producido hasta el día de hoy, en que nuestra Academia tiene el honor de presentar este Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas ante la sociedad española en general, y el sector sanitario, en particular.

La primera idea sobre la posibilidad de preparar un Diccionario de la Farmacia me la transmitió, como tantas otras cosas, mi maestro, el que fue Director de esta Real Academia de Farmacia, Profesor Rafael Cadórniga Carro, en 1995, ya que figuraba entre sus proyectos preferentes para desarrollar en los próximos años. En aquel momento aquella idea me pareció inabordable y pensaba que con la explosión de las nuevas fuentes de información y el auge extraordinario que tomaba Internet, el esfuerzo que supondría superaba ampliamente, en mi opinión, la utilidad del diccionario.

Las cosas cambiaron radicalmente en el año 2000 cuando coincidí en Alicante con el Profesor Enrique Alcaraz Varó, un destacado lingüista al que no conocía personalmente, pero del que tenía algunas referencias. El Profesor Alcaraz es Catedrático de Filología In-

glesa de la Universidad de Alicante, Director del Instituto Interuniversitario de Lenguas Modernas Aplicadas del País Valenciano y autor de varios diccionarios bilingües que han tenido amplia repercusión en los medios especializados. Para mí ha sido un privilegio trabajar con el Profesor Alcaraz y hoy, después de más de tres años de colaboración, me honra con su amistad. Aquel encuentro no fue casual, sino que fue propiciado por Joaquín Ronda Beltrán, entonces Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Alicante que organizaba un congreso internacional en la bella ciudad mediterránea. Joaquín Ronda ha prestado importantes servicios de la Farmacia Hospitalaria Española que han sido reconocidos tanto a nivel nacional como internacional. La intervención de Joaquín Ronda ha sido, sin duda, una de las claves para que este Diccionario Terminológico sea hoy una realidad. Gracias Joaquín.

Las conversaciones mantenidas con el Profesor Alcaraz durante aquel congreso y el análisis detenido que pude hacer en las siguientes semanas de dos de sus obras más conocidas: el Inglés Jurídico, que actualmente se encuentra en su décima edición y el Diccionario de Términos Económicos y Financieros español-inglés, inglés-español fueron esenciales para adoptar una decisión que había considerado incapaz de tomar cinco años antes. Fue entonces cuando recordé aquella sentencia del maestro Yoda a Luke Skywalker en la impactante película de George Lucas, de la serie de la Guerra de las Galaxias: *«No trates de hacerlo... ¡Hazlo! De lo contrario, ni siquiera vale la pena que lo intentes...»*

Esta obra no hubiera sido posible sin la entrega y dedicación de Raquel Martínez Motos, investigadora del Instituto Interuniversitario de Lenguas Modernas Aplicadas del País Valenciano, una de las autoras de la obra, y de Dolores Santos Buelga, profesora titular de la Universidad de Salamanca, que se ocupó de la revisión técnica de toda la obra y de la corrección final del manuscrito. Durante todo este tiempo las 1.200 páginas del diccionario volaron al menos cinco veces entre Salamanca y Alicante a través del correo electrónico, además de los 125 envíos de mensajería que se registraron durante la duración del proyecto. Nuestro agradecimiento a estas profesoras universitarias por el entusiasmo con el que acogieron este proyecto y, sobre todo, por el trabajo que han realizado. La colaboración entre profesores de las Universidades de Alicante y Salamanca ha

sido intensa, continua y fructífera y me gustaría destacarla hoy aquí, ante representantes de ambas universidades.

Los autores decidimos entonces que el diccionario fuese auspiciado por la Real Academia Nacional de Farmacia frente a otros organismos o instituciones públicas o privadas, por diversas razones, entre ellas el recuerdo del proyecto que el Profesor Cadórniga no pudo llegar a realizar. Además, pensamos que esta podía ser una obra importante para la Real Academia Nacional de Farmacia, que apoyase el esfuerzo que nuestra Corporación está haciendo durante los últimos años con sus publicaciones en el campo de las Ciencias de la Salud. En este sentido, nos dirigimos al entonces Director de esta Real Academia, el Profesor Julio Rodríguez Villanueva, que acogió nuestra propuesta para realizar este diccionario con el entusiasmo característico con el que siempre apoyó aquellos proyectos que consideraba de interés el que fue insigne Rector de la Universidad de Salamanca. Poco después se incorpora como nuevo Presidente de la Real Academia de Farmacia el Doctor Reol Tejada, a quien enviamos un Proyecto del Diccionario Terminológico en 2002 que trasladó, de forma inmediata, a la Junta de Gobierno para su aprobación definitiva. Por fin, a mediados de 2003, empezamos a introducir términos en nuestra base de datos. Durante estos tres años, el Señor Presidente manifestó su apoyo decidido por nuestro proyecto y se interesó por el progreso de nuestro trabajo, del que fue informado en todo momento, así como a los señores académicos, los cuales nos manifestaron desde el principio su disponibilidad de colaboración. En este sentido, también queremos agradecer a cuantos profesionales han colaborado con nosotros enviándonos, a través de la página web de la Academia términos relacionados con su especialidad. También agradecemos al Académico Secretario, Excmo. Señor Don Antonio Doadrio, su colaboración en la difusión del diccionario a través de la página web. Aprovecho este momento para enviar un saludo afectuoso a cuantos están conectados en este momento a través de la página web de la Real Academia Nacional de Farmacia y están siguiendo en directo este acto. Otra decisión importante fue la selección de editorial para la publicación de la obra, para lo que nos pusimos en contacto con Ariel, una referencia obligada en el mundo editorial español e iberoamericano en el área universitaria y a quien los autores queremos agradecer su favorable

acogida y su profesionalidad. Gracias a José Luis y a Consuelo, que creyeron en nuestro proyecto y nos animaron en todo momento.

La organización del diccionario fue, sin duda, uno de los puntos críticos de este ambicioso proyecto que obligaba, necesariamente, a fijar tanto el contenido como los límites de las Ciencias Farmacéuticas. Para ello comenzamos definiendo el núcleo de la Farmacia en los comienzos del siglo XXI, aquello que los financieros del sur de Manhattan conocen como el *core business*. Para nosotros, este núcleo consta de tres ejes fundamentales: el paciente, el medicamento y la salud pública. El paciente individual es, sin duda, el elemento esencial para la farmacia y la primera razón que justifica nuestra actividad profesional en el cuidado y promoción de la salud. Alrededor del enfermo gira toda la asistencia sanitaria donde nuestro trabajo y nuestros conocimientos deben contribuir principalmente a mejorar la calidad de la terapéutica farmacológica. En este sentido, me permito recordarles que el Congreso Mundial de Ciencias Farmacéuticas, celebrado a finales del mes de abril en Ámsterdam, tenía como lema: «*Optimising Drug Therapy: An Imperative for World Health*». La consideración de paciente individual frente al grupo de pacientes con un mismo diagnóstico es un hecho de extraordinaria importancia, muy especialmente en esta era de la genómica cuando ya hemos iniciado el genotipado de los pacientes para establecer tratamientos farmacológicos personalizados.

El medicamento es otro de los elementos clave en las Ciencias Farmacéuticas, ya que son calificadas de excepcionales las intervenciones sanitarias que no requieren el uso de medicamentos bien con fines diagnósticos, profilácticos o terapéuticos. Los medicamentos más utilizados en la terapéutica actual han sido incorporados al diccionario tanto en sus aspectos químico y farmacológico como terapéutico. Hemos dado especial relevancia a la seguridad de uso de los medicamentos en consonancia con las campañas internacionales como la Alianza Mundial para la Seguridad del Paciente de la OMS. Los nuevos medicamentos de origen biotecnológico o las nuevas terapias celulares tienen, lógicamente, acogida en este Diccionario Terminológico. El tercer eje lo constituye la Salud Pública, ya que la Farmacia, como profesión sanitaria que es, no puede permanecer ajena a aspectos tan importantes en el cuidado de la salud como la nutrición, la contaminación o las drogodependencias.

Alrededor de este centro neurálgico se disponen, en nuestra opinión, cuatro grandes áreas de conocimiento: las Ciencias Biomédicas, la Tecnología, el Derecho y la Economía. Dentro del área biomédica hemos incluido disciplinas esenciales de la Farmacia como la Farmacología y Terapéutica, Biofarmacia y Farmacocinética, Fisiopatología e Inmunología, etc. Además, se han introducido términos de otras disciplinas importantes para el desarrollo de las Ciencias Farmacéuticas como Biología Celular, Bioquímica, Microbiología, Parasitología, Físico-Química, etc.

El progreso de la farmacia ha estado asociado al desarrollo tecnológico que se ha producido, especialmente en los últimos treinta años. El desarrollo experimentado por la tecnología farmacéutica ha facilitado el diseño y producción de nuevas formulaciones farmacéuticas. Ello ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales, especialmente los polímeros biocompatibles, al mejor conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los medicamentos y al progreso experimentado por las operaciones industriales necesarias para la fabricación de estas formulaciones. Excipientes, nuevas formulaciones y operaciones farmacéuticas industriales han sido también incorporados al diccionario.

Entre las nuevas tecnologías, la biotecnología y la nanotecnología tienen una creciente importancia en las ciencias farmacéuticas. La biotecnología está permitiendo obtener nuevos fármacos inaccesibles para la síntesis química que se han incorporado al arsenal terapéutico en el tratamiento de importantes patologías como las enfermedades infecciosas y cardiovasculares, el cáncer, o la artritis reumatoide. La nanotecnología ya se ha convertido en una realidad en la tecnología farmacéutica con la incorporación de los primeros nanofármacos utilizados en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. La robótica y la automática se han incorporado a las plantas farmacéuticas y la instrumentación analítica como la electroforesis capilar, la ultracentrifugación o el dicroísmo circular han resuelto importantes problemas en la caracterización de la estructura de las proteínas terapéuticas más complejas. Finalmente, no cabe duda de que hoy en día la tecnología más moderna en el campo de la farmacogenética son los chips genéticos, también denominados biochips. Términos como clonación, hibridación bioinformática y genómica también han tenido cabida en el diccionario.

Muchos conceptos jurídicos tienen una importante repercusión en el mundo de la farmacia: las patentes, las marcas y la propiedad industrial, las regulaciones de ámbito nacional y europeo que hacen referencia al desarrollo de los nuevos medicamentos, las normativas referentes a las exigencias de calidad en la fabricación de medicamentos incluidas las farmacopeas o la reciente regulación europea sobre biosimilares ante la expiración de las primeras patentes de los fármacos biotecnológicos, son algunos ejemplos representativos recogidos en el diccionario. Algunos de estos aspectos se incluyen ya en el Derecho Administrativo y en el Derecho Mercantil.

Finalmente, la economía es un área inevitable cuando hablamos de la farmacia o de la financiación de los sistemas sanitarios. La sostenibilidad de los sistemas públicos de salud es actualmente un motivo de preocupación para los gestores sanitarios y, cada vez más, para los profesionales implicados en la utilización de medicamentos. Recuerdo en este momento las llamadas constantes, sin exagerar, casi a diario, del Profesor Alcaraz a mi despacho del Hospital Clínico comentándome algunas de las noticias de carácter económico que estaba leyendo en revistas de divulgación de ciencias de la salud y en uno de sus periódicos favoritos: *The Economist*. Así, me informaba sobre la subida de las acciones de Pfizer, los movimientos económicos de la *Big Pharmacy*, el impacto de los genéricos en los sistemas sanitarios o las consecuencias del *evergreening* para las compañías farmacéuticas innovadoras. En definitiva, la proyección económica de la farmacia. Los farmacéuticos españoles no hemos sabido valorar adecuadamente la importancia de incorporar las enseñanzas de la Farmacoeconomía dentro de los estudios de licenciatura, a diferencia de lo que han hecho los responsables académicos de Estados Unidos, Canadá y algunos países del norte de Europa. Hoy la Farmacoeconomía representa una herramienta valiosa en el desarrollo de nuevos medicamentos y en la toma de decisiones en la selección de alternativas terapéuticas. Algunas sociedades médicas, como lo Sociedad Española de Oncología Médica han incorporado, en sus programas de educación continuada a especialistas, los estudios de farmacoeconomía. Esperemos que la situación cambie pronto y nuestros alumnos salgan de la Facultad con amplios conocimientos sobre el significado del análisis de coste-efectividad.

El Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas, con 15.000 términos en la parte inglesa y más de 13.000 en la parte en español, se agrupa en 25 campos semánticos en los que se incluyen lo que constituye, en nuestra opinión, la visión actual de las Ciencias Farmacéuticas. Este Diccionario Terminológico pretende ser de utilidad para los profesionales y estudiosos de las ciencias de la salud para la administración sanitaria, la industria farmacéutica, y para todos aquellos profesionales que mantienen una relación estrecha con el mundo sanitario y particularmente con los medicamentos, como químicos, periodistas, abogados, economistas, traductores e intérpretes, etc.

Todos lo que hemos participado en este proyecto hemos dedicado, con entusiasmo, nuestro esfuerzo y nuestra experiencia a este trabajo apasionante y ahora nos sentimos recompensados. Tal como escribió Morrie Schwart en *Martes con mi viejo profesor*: «Haz las cosas que te salen del corazón. Cuando las hagas, no estarás insatisfecho, no tendrás envidia, no desearás las cosas de otra persona. Por el contrario, lo que recibirás a cambio te abrumará».

Excma. Señora Presidenta: en febrero de 2005, con motivo de la Audiencia concedida a esta Real Academia Nacional de Farmacia, S.M. el Rey Don Juan Carlos I se interesó por el desarrollo de los trabajos de este Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas. Le ruego que, en nombre de nuestra Corporación, transmita a la Casa Real que la obra ha finalizado.

Muchas gracias por su atención.

Aspectos del lenguaje en la farmacia

ENRIQUE ALCARAZ VARÓ

Catedrático de la Universidad de Alicante

Excma. Señora Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excmos. Señores Rectores de las Universidades de Alicante y Salamanca.

Excmas. Señoras y Señores Académicos.

Señoras y Señores:

1. Introducción

En primer lugar quiero expresar mi gran satisfacción por encontrarme en esta docta casa, para dar cuenta de que se ha culminado la labor que hace tres años encargó la Real Academia Nacional de Farmacia al Académico Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, a la Profesora Raquel Martínez y a quien tiene el honor de dirigirles la palabra. Al tiempo que manifiesto mi satisfacción, deseo expresar también mi agradecimiento por la confianza que en nosotros depositaron el entonces Presidente, el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol y todos los académicos, quienes respaldaron su iniciativa para la realización de nuestro trabajo.

En los quince minutos que me han asignado en este acto me gustaría hablarles de algunos aspectos del lenguaje de la farmacia. Pero antes querría decirles dos palabras sobre el diccionario. Como todos los diccionarios bilingües ofrece la traducción o equivalencia, lo cual no es suficiente. Es preciso delimitar el significado con una explicación, una frase contextualizadora, palabras relacionadas y sobre todo dónde ubicar la palabra dentro de los veinticinco campos semánticos que para nosotros constituyen la primera aproximación en el campo de las ciencias de la Farmacia. De esta forma pensamos que esa entidad tan resbaladiza llamada significado queda algo más fijada. Pero nos hemos marcado otro objetivo: el uso pensando en el

profesional que tenga que escribir en inglés. En estos quince minutos voy a hablarles de cuatro puntos: el lenguaje y el conocimiento, algunos rasgos particulares del lenguaje de la farmacia, el léxico farmacéutico y los géneros de la farmacia.

2. El lenguaje y el conocimiento. La interdisciplinariedad

Comenzaré por el lenguaje y el conocimiento. El lenguaje lo envuelve todo. Sin lenguaje todo es una nebulosa. Lo han dicho, entre otros, Saussure, Chomsky y, mucho antes, el filósofo Humbolt. Desde la antigüedad hasta nuestros días los libros nos están ofreciendo frases sobre la relación entre lenguaje y conocimiento. Para mí una de las más lapidarias es la pronunciada por el filósofo Wittgenstein: «Los límites de mi lenguaje son los límites del conocimiento».

Como el conocimiento es hoy uno de los valores más importantes de nuestra sociedad, se dice que vivimos en la «sociedad del conocimiento». Ésta es la denominación que se ha convenido en dar a la primera década del siglo XXI. Que vivimos en la «sociedad del conocimiento» no le cabe a nadie la menor duda, y lo sabemos no sólo porque nos lo están recordando continuamente los medios de comunicación, sino también porque somos testigos y beneficiarios de los grandes inventos que ha habido en los últimos años, por ejemplo, en la electrónica y en las ciencias de la salud, propiciados sin la menor duda por los avances del conocimiento. Debe recordarse, a estos efectos, que dos revistas internacionales, *The Economist* y *Newsweek*, entre otras, han dedicado en el año 2005 un número o un cuadernillo especial al análisis de los objetivos, los intereses, los rasgos definitorios y las novedades que conforman la sociedad del conocimiento, en relación con las que le precedieron.

En su cuadernillo, la revista *The Economist* decía en el mes de octubre de 2005, que hoy el activo más importante de la hoja de balance de las grandes multinacionales ya no son las tierras, lo que en inglés se llama *landed-property*, ni las instalaciones, *facilities* en esa lengua, sino el conocimiento, cuya forma jurídica son las patentes. A estos efectos, una sociedad mercantil es muy rica si es propietaria o titular de patentes. En los últimos cinco años ha subido como la espuma el número de patentes de las grandes empresas, en especial las

farmacéuticas. Poseer patentes, esto es, conocimiento reconocido por medios jurídicos, es gozar de perspectivas de futuro. *Knowledge* es la palabra inglesa para «conocimiento». Sobre el sustantivo *knowledge* ha dicho Bill Gates (2005: 100) que se ha convertido en un adjetivo. No ha intentado reducir su valor con esta apreciación; más bien, al contrario, ha querido resaltar su importancia por figurar repetidamente en posición atributiva formando parte de muchas de las unidades léxicas de nuestros días, como *knowledge economy*, *knowledge market*, *knowledge broker*, *knowledge community*, etc.

La sociedad del conocimiento ha impulsado igualmente, además, dos cuestiones que considero básicas: por una parte, un nuevo replanteamiento de la organización del conocimiento y, por otra, la interdisciplinariedad o fecundación entre distintos métodos y contenidos. Gracias a esa interdisciplinariedad hemos podido colaborar unos lingüistas con unos científicos de las ciencias farmacéuticas en la confección del diccionario terminológico bilingüe.

3. Rasgos del lenguaje de las Ciencias Farmacéuticas

El lenguaje de estas ciencias comparte los rasgos generales del lenguaje científico, pero tiene, además, unas características muy particulares:

- a) **Un equilibrio entre lo aristocrático y lo popular.** Utilizo el término aristocrático en su connotación de «culto», es decir, en la que nos remite a nuestras raíces grecolatinas. Tomemos, por ejemplo, la palabra «adrenalina». Por poco que indagemos en su etimología nos encontraremos la preposición latina «ad» y la palabra *renalis*, de la misma lengua. Y en otro término relacionado con el anterior, «epinefrina», en este caso vemos el prefijo «epi» y el sustantivo «nefro», los dos de origen griego. La lista es larguísima, como ya saben ustedes por ser los especialistas. Añadiré un término más modesto que justifica esta fascinación por lo aristocrático. Me refiero a «algodón hidrófilo», que en los Estados Unidos se dice *absorbent cotton*, y *cotton wool* en el Reino Unido. En español, en cambio, se prefiere una imagen casi poética, la de «amante del agua» y, además, se expresa con palabras latinas.

- b) **Los dobles.** ¿Qué es lo que ocurre en inglés? Se puede decir que lo mismo que en español. Por ejemplo, cuentan con *analgesic*, la voz culta, y también con *painkiller*, la popular. Pero esta lengua tiene una peculiaridad muy específica, dado que el inglés no es una sola lengua. Son dos en una, desde que en 1066 Guillermo el Conquistador, partiendo de Normandía, invadiera Inglaterra e impusiera el francés como lengua oficial. A consecuencia de este hecho, las cosas se pueden decir de dos maneras en inglés. Así, existe *timid* y *shy*, *bring down prices* y *reduce prices*, etc. Y lo mismo sucede en el lenguaje de la farmacia. De esta forma, surgen dobles como *over-the-counter drug* y *non-prescription drug*, *water tablets* y *diuretics*, *blood thinners* y *anticoagulants*, *injection* y *shot*, etc.
- c) **Los anglicismos.** Otro rasgo de este lenguaje es el elevado número de anglicismos. Los anglicismos suelen estar denotados, debido a su abuso, entendiéndose por abuso el empleo innecesario o injustificado de una palabra anglosajona cuando lo que haría falta es buscar y cultivar la que tenemos en español. Un ejemplo claro sería la palabra *sponsor*, para lo cual tenemos una muy bella llamada: «patrocinador» o incluso «mecenas». Sin embargo, en su justa medida, los anglicismos pueden resultar atractivos por tres motivos: primero, la brevedad de las palabras de origen anglosajón; segundo, la precisión, ya que una vez acuñados, su significado queda fijado de forma permanente; y tercero, la nivelación lingüística, que hace que se conviertan en términos aceptados en casi todas las lenguas de cultura. En mi opinión, el lenguaje de las ciencias de la Farmacia está incorporando de forma inteligente lo que se llaman anglicismos crudos, esto es, sin adaptar al español, como *spray*, *marketing*, *screening*, etc. Como afirma Christian Balliu (2000: 30-39), términos como *randomization* y *screening* se mueven con toda comodidad en el léxico de las ciencias de la salud y no son muchos los que utilizarían hoy «distribución aleatoria» por el primero, o «despistaje» por el segundo. También han entrado otros anglicismos, no en su forma cruda, sino adaptándose a nuestras normas morfológicas. Me refiero, por ejemplo, a *blister* y

a *stress*. El primero ha dado, con naturalidad, «emblistar» y «emblistado» y el segundo no ha tenido problemas en la creación de «estresar» o de «estresante».

- d) **Los falsos amigos. La tentación paronímica.** Al pasar de una lengua a otra siempre surge la tentación de dejarse arrastrar por los parónimos, esto es, los homófonos y los homógrafos, palabras que se pronuncian igual o que se escriben de la misma manera. Muchos de ellos se convierten en «falsos amigos». Citaré tres de los más conocidos: *constipation*, *piles* y *gripe*. *Piles* no es «pilas» o «batería» sino «hemorroides», *gripe* no es «gripe» sino «cólico o retortijón», y *constipated* no es «constipado», en el sentido de «resfriado», sino «estreñido», aunque también en español «constipación» se usa en el sentido de «irritación de las mucosas del intestino que produce estreñimiento». Otro también muy llamativo es *preservative*, que significa «conservante».

4. Clasificación del léxico de las ciencias farmacéuticas

El léxico es el componente lingüístico que mejor cumple la función simbólica del lenguaje, ya que muestra los «estados de cosas», de acuerdo con las necesidades científico-técnicas, culturales, ideológicas, etc., de la comunidad epistemológica en la que el lenguaje está inmerso. El léxico se divide en técnico, semitécnico y común de uso frecuente:

- a) El vocabulario técnico. Voy a citar una palabra técnica muy farmacéutica: *dosis*. Según el DRAE es la «toma de medicina que se da al enfermo cada vez» y que el *Oxford English Dictionary* define como «*a definite quantity of a medicine or drug given or prescribed to be given at one time*». Luego, ambos diccionarios dan significados figurados o transferidos del significado inicial como, por ejemplo, «dosis de paciencia», etc. Como pueden imaginar, la lista de palabras técnicas, en especial, es muy amplia en ambas lenguas: *analgesics*, *anaesthetics*, *antiallergic*, *antibiotics*, *antidepressant*, *antihypertensive*, *anti-inflammatory*, *anxiolytic*, *tranquilizer*, *diuretics*, *hypnotics*, *sedatives*, etc. El grueso de este grupo está forma-

do principalmente, aunque no en exclusiva, por la nomenclatura farmacológica.

- b) El segundo grupo, el «vocabulario semitécnico», está constituido por unidades léxicas del lenguaje común que han adquirido uno o varios nuevos significados dentro de un campo del saber. Citaré una palabra: *absorption*, la cual interesa por su significado general (*soaking up, swallowing up, taking in, drinking in*, etc.) y por su acepción en el mundo de la economía. En el ámbito de la farmacología tiene, al menos, dos acepciones especializadas: (1) paso o movimiento de un principio activo desde el lugar de administración hasta la circulación de la sangre, por ejemplo, *Decongestants may affect the absorption of paracetamol*, y (2) eliminación de tejidos o depósitos, como cuando decimos *This recent medicine promotes the absorption of the new formed substance*.
- c) El vocabulario del tronco común frecuente en las ciencias farmacéuticas es amplísimo. Destacaré algunos como *action* (acción), *effect* (efecto), *substance* (sustancia), *agent* (agente), *ingredient* (ingrediente), *reaction* (reacción), *mix* (mezcla), *breakthrough* (avance, descubrimiento), *test* (prueba, análisis), *prove* (demostrar), etc.

5. Los géneros de la farmacia

Por último hablaré de los géneros. Esta palabra la utilizamos los lingüistas normalmente aplicada al mundo de la literatura. Se llaman géneros porque son tipos textuales que poseen en común muchos rasgos «genéricos». Decimos, por ejemplo, que la novela es un género, o que el soneto es otro género. Sin embargo, el término se ha ampliado a lo que llamamos géneros profesionales. Un género profesional muy importante en el mundo de la farmacia es el llamado *patient information leaflets*, esto es, el prospecto de los medicamentos. La Administración norteamericana, entre ellas, la *Food and Drug Administration* y, por supuesto, nuestra Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, así como todos los organismos reguladores de nuestro país están muy preocupados por la claridad en el lenguaje. En los Estados Unidos todo empezó hace años con un

movimiento llamado *Plain English Campaign*, por medio del cual los ciudadanos han dado a entender que quieren enterarse de lo que dicen las Administraciones, incluida la de Justicia. El Presidente Clinton fue muy sensible a esta campaña e instituyó en su día el llamado *Plain English Award*, distinción que se concede todos los años a los funcionarios que se hayan esforzado por mejorar el lenguaje dirigido a los ciudadanos o administrados. Todos sabemos que la falta de claridad en el lenguaje de los prospectos con que se dispensan alimentos, productos alimenticios o cosméticos puede ser la causa de muchos, muchos pleitos. Se ha notado recientemente, en lo que a este género se refiere, el paso de un discurso descriptivo a otro más interactivo. Por ejemplo, en la mayoría de los prospectos se podrán encontrar preguntas que sigan un estilo interactivo similar a éste: «Si contesta de forma positiva a algunas de estas preguntas, usted no debe tomar este fármaco»:

Have you had any allergic reaction to aspirin?

Are you allergic to other pain-killers?

Are you taking regular medication for high-blood pressure?

Are you pregnant?

Are you breast-feeding? etc.

6. Conclusión

No querría terminar mis palabras sin citar a dos personas que han tenido mucho que ver con el diccionario. Me refiero al Jefe del Servicio del Hospital General de Alicante, Don Joaquín Ronda Beltrán, y a la Doctora Dolores Santos Buerga, Profesora Titular de Historia de la Farmacia de la Universidad de Salamanca. Del primero surgió la idea embrionaria del diccionario, que ofreció en una comida de presentación al académico Domínguez Gil-Hurlé y al que tiene el honor de dirigirles la palabra. La segunda ha efectuado una esmerada revisión de todo el texto, aportando, además, valiosas sugerencias, la mayoría de las cuales han sido incorporadas. También debe recibir unas palabras de reconocimiento la Editorial Ariel por la pulcritud y profesionalidad de la que ha hecho gala en esta excelente publicación. Y, por último, debo dar las gracias al académico

Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, que me visitó un día en Alicante para proponerme el proyecto en nombre de la Academia, por haberme ayudado a entender y a querer más, si cabe, el para todos los humanos imprescindible mundo de la farmacia. Muchas gracias.

Noticias

El Doctor Joan Massagué, Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia, descubre la clave de la metástasis de cáncer de pulmón.

* * *

La Presidenta de esta Academia, Excma. Señora Doña M.^a Teresa Miras Portugal, pronunció una conferencia sobre «Cultura bioquímica, desarrollo de fármacos y futuro», el miércoles 18 de abril, a las 19,30 horas, en la Fundación Española para la Ciencia y Tecnología, Fundación José Ortega y Gasset.

* * *

El pasado 22 de abril, en Ámsterdam, el profesor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé recibió el premio de la Federación Farmacéutica Internacional (FIP) correspondiente al año 2007.

* * *

El 10 de mayo, en nuestra sede, fue presentado el Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas, patrocinado por la Real Academia Nacional de Farmacia y coordinado por el Académico de Número, Profesor Doctor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, junto a los Doctores Enrique Alcaraz y Raquel Martínez.

* * *

Del 4 al 7 de junio se celebrará en nuestra Sede el II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia.

* * *

El pasado 5 de mayo al Excmo. Señor Don Joan Guinovart, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, le fue concedido el título de Hijo Predilecto de Tarragona. El acto tuvo

lugar en el Salón de Sessions del Palau Municipal de Tarragona y fue presidido por el Alcalde de dicha ciudad, Don Joan Miquel Nadal i Malé.

* * *

El Profesor Víctor Jiménez, Académico de Número, pronunció una conferencia en el XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, celebrado en Sevilla del 30 de mayo al día 1 de junio.

* * *

El Profesor José Luis Vila Jato, Académico de Número, ha sido invitado para impartir la conferencia: «Visión farmacéutica de la nanotecnología», en la Jornada Internacional sobre Implicaciones de la Nanotecnología en la salud y medio ambiente, que se celebrará en Barcelona el día 29 de octubre organizado por Barcelona Nanotechnology Cluster bajo el patrocinio de la Fundación Areces.

* * *

El 31 de mayo, el Pleno de la Real Academia Nacional de Farmacia designó al Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de Honor de la misma, siéndole entregado el Diploma conmemorativo de esa Sesión, por la Presidenta Excma. Señora M.^a Teresa Miras Portugal, el 4 de junio, en la inauguración del II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia, en presencia del Secretario de Estado de Universidades, Directora General de Farmacia, Presidente de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de los Presidentes de las Academias de Farmacia de Chile, Brasil, Argentina, México, Perú, Paraguay, Cataluña, Galicia, Iberoamericana y Santa María de España.

* * *

El 31 de mayo, la Real Academia Nacional de Farmacia, reunida en Asamblea General, acordó otorgar la Medalla Carracido en su

categoría de Oro, al Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva, en atención a sus innumerables méritos científicos y académicos en beneficio de las ciencias farmacéuticas.

* * *

El 31 de mayo fue elegido Académico de Número, medalla 27, el Excmo. Señor Don José Miguel Ortiz Melón.

Noticias de la Biblioteca

En reconocimiento de gratitud se comunica que la Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia ha recibido las siguientes donaciones:

- A) Doctor Don Alfio Piva: nueve monografías editadas por el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO) en 2005 y 2006.
- B) Doctora Doña Consuelo de la Torre: un original de *la Medicina Homeopática Doméstica* de C. Hering, traducida y anotada por Álvarez de Araujo, 8.^a edición española (1873).

Se agradece también al Doctor Fernández Braña la entrega de diversas colecciones de publicaciones periódicas actuales que se han incorporado a nuestros fondos bibliográficos a lo largo del año 2006. Asimismo, se indica que en la Biblioteca se ha abierto un libro registro de donaciones. Se invita a todos los académicos a contribuir al enriquecimiento de la biblioteca con la donación de obras de consulta y especial relieve.

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Política Editorial

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

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

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

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

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

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

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

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

- 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. 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

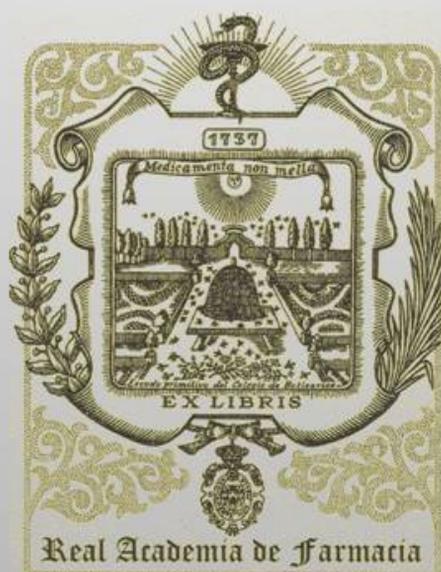
Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

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
POLÍTICA SOCIAL Y DEPORTE

www.ranf.com

ISSN 1697-4271