

ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE

FARMACIA



2007

VOLUMEN LXXIII

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

• 28004 MADRID

Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea

Recibido el 21 de mayo de 2007

FRANCISCO J. SÁNCHEZ MUNIZ*

*Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición).
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid*

RESUMEN

En este trabajo se revisan algunos aspectos históricos sobre el aceite de oliva, así como su importancia cultural y nutricional. Posteriormente, se definen los diferentes tipos de aceites de oliva y sus características principales y se discuten los beneficios del consumo de aceite de oliva virgen en el ámbito de la dieta mediterránea.

Se insiste que no hay dieta mediterránea sin consumir alimentos fritos, ya que la fritura es una técnica muy extendida y muy utilizada en la Cuenca Mediterránea y se dan ciertos consejos sobre la utilización del aceite en crudo y en fritura.

Basado en la baja mortalidad cardiovascular encontrada en países del Área Mediterránea respecto a poblaciones de otras latitudes, se señala que esta dieta ha sido propuesta como modelo a seguir para conseguir un estatus nutricional correcto y una adecuada protección contra enfermedades degenerativas muy prevalentes en las sociedades desarrolladas. La dieta mediterránea clásica se define con una estructura piramidal que está basada principalmente en alimentos vegetales, siendo obligado el consumo diario de aceite de oliva virgen, el cual es, con mucho, su principal fuente de grasa culinaria. Contiene además pequeñas cantidades de alimentos de origen animal (en forma de pescados y lácteos) y el consumo diario moderado de bebidas alcohólicas, principalmente en forma de vino tinto y consumido durante las comidas, es otra de sus características. Dicho modelo dietético implica equilibrio entre ingesta y gasto energético.

* Catedrático de Nutrición y Bromatología.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
e-mail: frasan@farm.ucm.es

Los efectos beneficiosos del aceite de oliva se tratan en extensión en tres subapartados donde se revisan sus acciones en aspectos de salud de gran importancia social y económica: Longevidad y supervivencia; enfermedad cardiovascular y cáncer. Tales beneficios se han atribuido a su composición en ácidos grasos, muy rico en ácidos grasos monoinsaturados y con una concentración moderada en ácidos grasos saturados y poliinsaturados. Además posee compuestos antioxidantes y la relación ácidos grasos poliinsaturados/tocoferoles es más adecuada que la de otros aceites para prevenir la oxidación lipídica. En los aceites de oliva virgen y virgen extra se han encontrado y cuantificado biofenoles con propiedades antioxidantes muy importantes y con papeles en la modulación de la aterogénesis y posiblemente en el cáncer. Se presentan y discuten algunos trabajos recientes donde se señalan posibles mecanismos de acción de estos compuestos.

La revisión termina planteando que el consumo de aceite de oliva ayuda a alcanzar un perfil lipídico dietético más correcto y en línea con los objetivos y recomendaciones nutricionales actuales.

Palabras clave: Aceite de oliva.—Dieta mediterránea.—Enfermedad cardiovascular.—Envejecimiento.—Cáncer.

ABSTRACT

Olive oil, life key in the Mediterranean area

In this paper some historical aspects of olive oil are reviewed, as well as its cultural and nutritional importance. The different types of olive oil as their characteristics are described and their benefits discussed in the framework of the Mediterranean diet.

Mediterranean Diet and frying are non separable concepts. In fact, this is a culinary technique extendedly employed in the Mediterranean Basin. Moreover, some advices are given to properly use the olive oil as fresh as in frying.

Based on the low cardiovascular mortality found in the Mediterranean cohorts respect to other counterparts from different World parts, this diet has been proposed as a model to get a correct nutritional status and to get a significant protection against degenerative diseases very prevalent in Developed countries. The classical Mediterranean diet can be defined with a pyramidal structure based in vegetable foods, being obliged the inclusion of virgin olive oil as practically the only culinary food. Its also contains small amounts of foods from animal origin (mainly fish and dairy products). Wine daily consumed with moderation during meals is also one of its important characteristics. Such dietetic model implies the balance between energy income and expenditure.

Beneficial effects of olive oils are discussed in three subsections focussing them on health aspects of great social and economical importance: Aging and longevity; cardiovascular disease and cancer. Such benefits have been attributed to its fatty acid composition, very rich in monounsaturated fatty acids, and moderate in saturate and polyunsaturated fatty acids. Furthermore, virgin olive oils contain antioxidant compounds and the polyunsaturated fatty acid/tocopherol ratio is more

adequate to prevent from lipid oxidation than that of most consumed oils. In the virgin and extra virgin olive oils have been found and quantified biophenols with very important antioxidant properties and role in atherogenesis and cancer. Some recent papers and the proposed molecular mechanisms are also presented and discussed.

The review ends concluding that consuming olive oil helps to get a more correct lipid profile and in line with very actual nutritional guidelines and recommendations.

Key words: Olive oil.—Mediterranean diet.—Cardiovascular disease.—Aging.—Cancer.

BREVE RECORDATORIO HISTÓRICO SOBRE EL ACEITE DE OLIVA

La etimología de la palabra olivo no es precisa y existen diversas teorías sobre su origen. Los nombres vulgares del árbol derivan de dos fuentes únicas: la griega *Elaia* y la hebrea *Zait*, que posteriormente quedan transformadas en la latina *Olea* y la árabe *Zaitum*. La palabra aceite deriva del vocablo árabe *Az-zait* que significa jugo de la oliva (1).

El origen de la *Olea europea* es discutido, aunque la palinología ha demostrado que apareció en la Era Terciaria (2). Su presencia en la Cuenca Mediterránea testificada por trazas de polen se remonta a 3,2 millones de años (3). Las áreas ribereñas mediterráneas fueron muy probablemente las zonas de nacimiento del olivo silvestre (*Olea europea*, var. *sylvestris*), quizá como resultado de la hibridación de las subespecies *O.e. ssp laperrinei* y *O.e. ssp cuspidata*, hace más de medio millón de años (4). No obstante, también existen bosques de este árbol en el Atlas, montañas de Túnez y Europa y en zonas meridionales de España y Portugal. Hoy por hoy aceptamos que el cultivo del olivo se inició muy probablemente en Siria, Líbano, Israel, Turquía unos 4.000 años antes de Cristo. Otra teoría menos consensuada es que el olivo procede de la especie *Olea chrysophylla*, extendida en las montañas de Etiopía, Kenia, Uganda y áreas vecinas (5).

Las tablillas micénicas son los documentos escritos más antiguos sobre el aceite de oliva, y dan una idea de la importancia que hace 4.500 años tenía este aceite en la corte del rey Minos (6). Los centros administradores de Cnosos, Pilo, Mecenas, Tebas, Tirinte proporcio-

nan documentos sobre la importancia de distintos tipos de aceite de oliva, sus medios de transporte, empleo alimentario e industrial del aceite y las aceitunas. En Egipto, el cultivo del olivo se inicia muy probablemente al oeste del delta del Nilo. Sin embargo, la utilización debió estar reducida a ciertas áreas, lo que obligaba a importar para alimentación, perfumes y ofrendas aceite de oliva de Palestina (1, 4).

Para muchos, Grecia fue cuna del olivo y se basan en el mito de la fundación de Atenas en siglo XVII antes de Cristo (1). «Palas Atenea y Poseidón disputaron por tomar posesión de aquella colonia y darle nombre. Poseidón hizo surgir, cuando golpeó el suelo de aquella población, un caballo brioso, vital, veloz, potente, capaz de acarrear pesados carros y ganar batallas. Atenea, en cambio, hizo brotar un olivo, símbolo de paz y capaz por la generosidad de su aceite, de dar llama para iluminar las noches, de suavizar las heridas, de ser un alimento precioso, rico en sabor y dador de energía y salud. En la asamblea, los hombres votaron por Poseidón, las mujeres que estaban en mayoría simple por Palas Atenea y la diosa... triunfó».

El olivo fue elevado a árbol de Gloria y de dioses, ya que hojas de olivo formaban parte de la corona de la justicia que colocaban en la cabeza de faraones como Tuthankamon. Moisés, príncipe egipcio, recibe en su educación multitud de orientaciones sobre la utilización de aceite de oliva para ofrendas y alimentación. Homero en la Odisea y en la Iliada señala que al vencedor de los concursos gimnásticos de Atenas, llamados Panaceas, eran donadas como premio al ganador toda la cosecha de aceite obtenida en las plantaciones del Atica.

La Biblia cita más de 200 veces el término aceite, con muchas referencias a sus usos culinarios y religiosos. En el Génesis (8,12) se indica que Noé soltó una paloma y que regresó al arca «trayendo en el pico una ramita verde de olivo, símbolo del restablecimiento de la paz entre Dios y los hombres». En el Deuteronomio (33,24) se señala a la tierra de Aser (Palestina) como país rico en olivos y aceite: «Bendito más que otros hijos Aser, sea favorito entre sus hermanos; en el aceite meterá sus pies». En el Éxodo, Moisés escucha de Yahvé cómo obtener aceite para la sagrada unción. En el Levítico (2,1) encontramos: «Quien quiera ofrecer una oblación de homenaje al Señor, haga su oblación de flor de harina, y derramará encima aceite y pondrá sobre ella aceite y pondrá sobre ella incienso (1). El

Coran comenta (23:20): «El árbol que brota en el Monte Sinaí que da grasa y condimento a los comedores»; o en (24:35): «Dios es la luz de los cielos y de la tierra. Su luz es a semejanza de una hornacina en la que haya una candileja. La candileja está en un recipiente de vidrio que parece un astro rutilante. Se enciende gracias a un árbol bendito, el olivo, no oriental ni occidental, cuyo aceite casi reluce aunque no lo toque el fuego. Luz sobre luz» (1).

Se desconoce la época en que se inicia el cultivo del olivo en España, aunque se acepta que se debió a los fenicios o los griegos, aunque su cultivo no logró demasiada importancia hasta la romanización. El descubrimiento del monte Testaccio en 1878 por Heinrich Dressell, junto al río Tiber, define claramente la importancia que tuvo el aceite hispano en el imperio romano. Este monte está integrado por trozos de unos 40 millones de ánforas que se utilizaron para el transporte de aceite desde la Bética y desde el 138 al 260 después de Cristo salieron para este puerto de Itálica más de dos millones de toneladas de aceite (1). La continuidad del comercio oleícola con Roma se extiende al menos hasta el siglo V de nuestra era y estuvo basada en su calidad que competía con éxito frente a los aceites de la Apuglia y la Campania.

Según información escrita, el olivo se extendía por la mitad meridional de Hispania. Plinio alaba el cultivo de la Bética y las aceitunas de la Emerita Augusta. Apiano habla de los olivares del sistema central arriba del Tajo, Avieno denominó al río Ebro como «oleum flumen», lo que sugiere la existencia de olivos en las Áreas de César Augusta y de la Ilerda. La caída del imperio romano también supuso la del cultivo del olivo, pero más tarde la olivicultura se recuperó con los visigodos.

Durante la denominación árabe, el aceite de oliva tuvo un especial relieve. El Idrisi reseña plantaciones en Jaca, Lérida, Mezquienza y Fraga. Son ilustres las zonas de Priego, Cabra y Arcos y como mejor aceite el del Aljarafe de Sevilla. Abu-Zacharia-Ebn-El-Awan, en el siglo XII, habla de los bosques de olivos junto a Sevilla y lo admirable del aceite de Astigi (Sevilla).

Alonso de Herrera en su *Agricultura General* señala la importancia que debió tener el olivo en España en el siglo XVI, ocupando una extensión probablemente superior a la actual.

Las limitaciones de espacio no me permiten hablar en extensión de otros aspectos históricos indiscutiblemente interesantes, pero baste comentar que en la España de los Reyes Católicos el gazpacho con aceite y vinagre constituía una parte básica de la dieta de Extremadura y Andalucía (1).

TIPOS DE ACEITES DE OLIVA Y COMPOSICIÓN

El olivo es un árbol no muy exigente, de cultivos relativamente fáciles, aunque prefiere terrenos arenosos, calizos, bien drenados. Soporta temperaturas extremas en las provincias de Sevilla y Córdoba en verano y de Toledo o Teruel en invierno. Es un árbol longevo y poderoso como el propio mediterráneo. Su vida puede llegar a ser bimilenaria.

El número de variedades cultivables del olivo es bastante elevado, alrededor de 260 variedades en España, aunque unas veinte son las más cultivadas, existiendo ya unas 20 denominaciones de origen para el aceite de oliva virgen (7) (Tabla 1).

TABLA 1. *Denominaciones de Origen de Aceites de Oliva. En la actualidad están en vías de aceptación nuevas denominaciones de origen, como la de Aceites de Oliva de Madrid, cuya variedad de olivo más común es Cornicabra*

<i>Denominaciones de origen</i>	<i>Zonas de producción</i>	<i>Variedades de olivo</i>
1. Les Garrigues	Lleida	Arbequina y Verdiell
2. Aceite del Bajo Aragón	Zaragoza y Teruel	Empeltre, Arbequina y Royal
3. Siurana	Tarragona	Arbequina, Royal y Morrut
4. Gata-Hurdes	Cáceres	Manzanilla Cacerense
5. Montes de Toledo	Toledo y Ciudad Real	Cornicabra
6. Aceite Montserri	Badajoz	Cornezuelo y Picual o Jabata
7. Sierra de Segura	Jaén	Picual, Verdala, Royal y Manzanillo de Jaén
8. Sierra de Cazorla	Jaén	Picual y Royal de Jaén

TABLA 1. *Denominaciones de Origen de Aceites de Oliva. En la actualidad están en vías de aceptación nuevas denominaciones de origen, como la de Aceites de Oliva de Madrid, cuya variedad de olivo más común es Cornicabra (cont.)*

<i>Denominaciones de origen</i>	<i>Zonas de producción</i>	<i>Variedades de olivo</i>
9. Sierra Mágica	Jaén	Picual y Manzanillo de Jaén
10. Baena	Córdoba	Picudo, Lechín, Chorúa, Pajarero, Hojiblanca y Picual
11. Priego de Córdoba	Córdoba	Picudo, Hojiblanca y Picual
12. Montes de Granada	Granada	Picual, Lucio, Loaime, Hojiblanca, Gordal de Granada, Negrillo de Iznalloz y Escarabajuelo
13. Sierra de Cádiz	Cádiz y sur de Sevilla	Lechín, Manzanilla, Verdial, Hojiblanca, Picual, Alameña y Arbequina
14. Baix Ebre-Montsià	Tarragona	Morruda o Morrut, Sevillenca y Farga
15. La Rioja	La Rioja	Sin señalar
16. Mallorca	Mallorca	Empeltre, Arbequina y Picual
17. Terra Alta	Suroeste de Cataluña	Empeltre y las variedades secundarias: Arbequina, Morruda y Farga
18. Antequera	Málaga	Hojiblanca, Picual o Marteño, Arbequina, Lechín de Sevilla o Zorzaleño, Gordal de Archidona, Picudo, Verdial de Vélez-Málaga y Verdial de Huévar
19. Poniente de Granada	Oeste de Granada	Picudo, Picual o Marteño, Hojiblanca, Lucio, Nevadillo de Alhama de Granada y Loaime

En las almazaras a partir de las aceitunas se obtienen Aceites de Oliva Virgen y Orujos (Figura 1). Los primeros se subdividen en Aceite de Oliva Virgen Extra, Aceite de Oliva Virgen y Aceite de Oliva Virgen Lampante. El Virgen Extra presenta características irreprochables de sabor y olor y una acidez menor o igual a $0,8^\circ$, el segundo también debe tener características irreprochables de sabor y olor y una acidez menor o igual a 2° . El Aceite de Oliva Virgen Lampante no es válido para consumo directo por su elevada acidez y debe ser refinado. Debido a que en este proceso pierde muchos de sus compuestos minoritarios, es encabezado con aceite de oliva virgen dando lugar a un aceite que se conoce como aceite de oliva cuya acidez debe ser menor de $1,5^\circ$ (8). El orujo es la parte sólida de la pasta de aceitunas retenida en las almazaras durante el prensado o ya mucho más comúnmente durante la centrifugación de masas. Esta parte sólida de la pasta contiene la mayor parte de la piel, pulpa agotada y trozos de huesos, reteniendo algo de aceite (5-10%) que hace rentable su recuperación. Mediante la extracción se produce el Aceite de Orujo de Aceituna o Aceite de Orujo bruto. Este aceite es refinado produciendo un Aceite de Orujo refinado cuya acidez debe ser menor a $0,3^\circ$. Para dotar a este aceite de ciertos compuestos (por ejemplo, tocoferoles) se

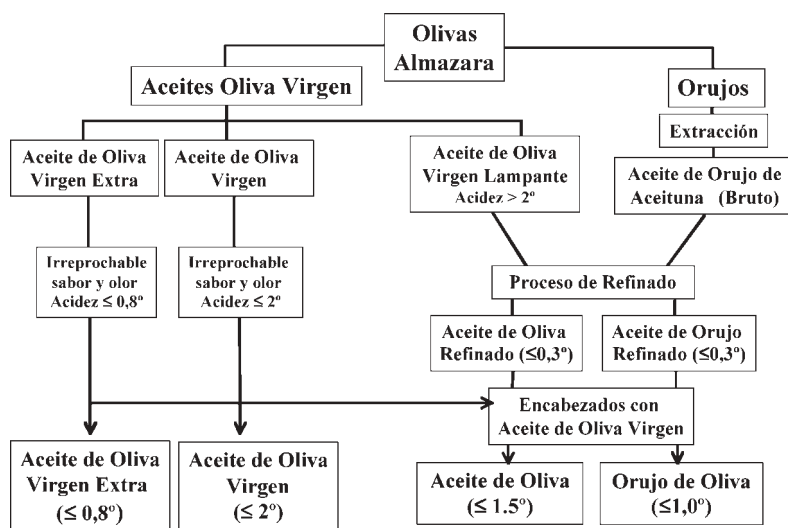


FIGURA 1. *Tipos de Aceite de Oliva y de Orujo de Oliva.* Adaptado del Diario Oficial de la Unión Europea (8).

le encabeza con Aceite de Oliva Virgen, originándose el Aceite de Orujo de Oliva cuya acidez debe ser menor o igual a 1,0° (8).

Existen en el mercado diversos tipos de aceites de oliva y de orujo de oliva que se diferencian en su composición, proceso de obtención, grado de acidez, cualidades organolépticas, etc. Ambos están integrados principalmente por triglicéridos, y en menor proporción por ácidos grasos libres y alrededor del 1% de constituyentes no glicéricos (9). Estos constituyentes menores son importantes para la estabilidad, sabor y aroma del aceite de oliva. Su análisis cuantitativo determina de forma importante la autenticación de los diversos tipos de aceites vírgenes de oliva, de oliva y de orujo de oliva.

Los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite de oliva son: palmítico, esteárico, oleico y linoleico (9). Contiene además otros ácidos grasos, pero es relevante su muy bajo contenido en isómeros *trans*. Los factores que afectan la composición en ácidos grasos son muy variables: latitud, condiciones climáticas, variedad y grado de madurez de las aceitunas. Cuando se pretenda consumir un aceite muy rico en oleico deberemos buscar las variedades Picual, Cornicabra; cuando busquemos algo menos de oleico y más de linoleico, las variedades Arbequina y Verdial serán una buena elección (Figura 2).

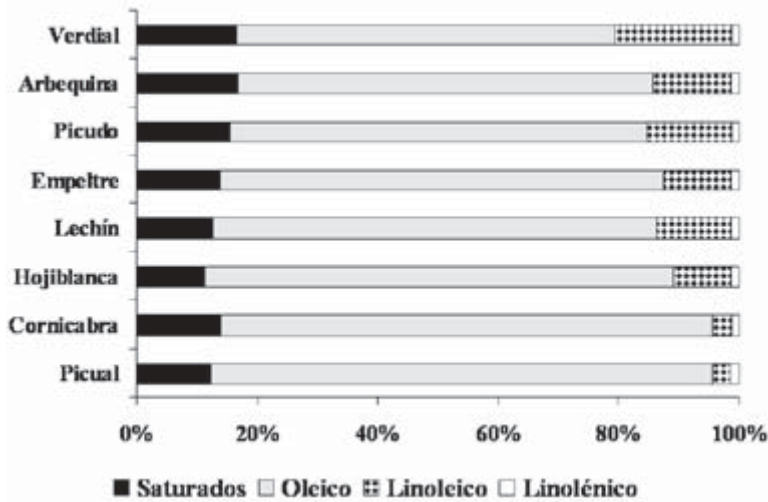


FIGURA 2. *Contenido en ácidos grasos de aceitunas de mayor producción en España. Adaptado de Jiménez-López y col. (70).*

Según Boskou y col. (9) los aceites de oliva pueden clasificarse en dos tipos: Uno con bajo contenido en ácidos linoleico-palmítico y alto en ácido oleico, y otro con un contenido alto en linoleico-palmítico y bajo en oleico. Los aceites de España, Italia y Grecia suelen ser del primer tipo, los tunecinos del segundo.

Dada la composición de ácidos grasos, un total de 70 o más triglicéridos pueden estar presentes en el aceite de oliva, no obstante, algunos de ellos no aparecen o lo hacen en cantidades muy pequeñas. Significativo es el contenido de trioleína (40-59%) (9).

Los constituyentes menores pueden dividirse en dos grupos. El primero consta de derivados de ácidos grasos, tales como mono y diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides. El segundo incluye compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos como: hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos polares (Figura 3). Estos últimos son muy escasos o están ausentes en otros aceites. Tirosol e hidroxitirosol están considerados como los principales constituyentes. Otros frecuentes son oleuropeína, ácido cafeico, ácido vinílico, ácido sirínico, ácidos cumáricos (10).

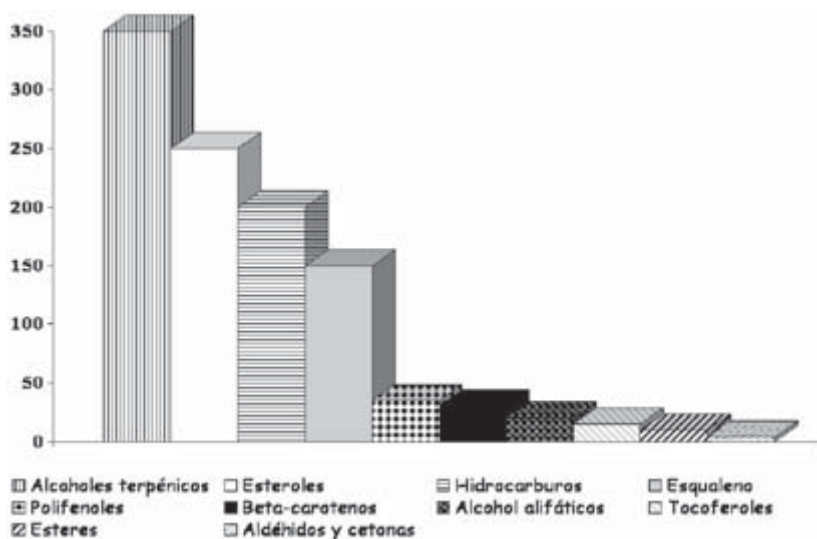


FIGURA 3. *Tipos de componentes minoritarios en el Aceite de Oliva Virgen.*

Adaptado de Jiménez-López y col. (70).

En la Figura 4 se presenta el contenido de tocoferol y de polifenoles de once variedades de aceites de oliva virgen (11). Cornicabra, Changlot Real y Picual son los más ricos en polifenoles totales, Changlot Real, Empeltre y Hojiblanca en tocoferoles (11). La relación ácido oleico/ácido linoleico/tocoferoles/polifenoles condiciona de forma importante la estabilidad del aceite a temperatura ambiente y de fritura (12).

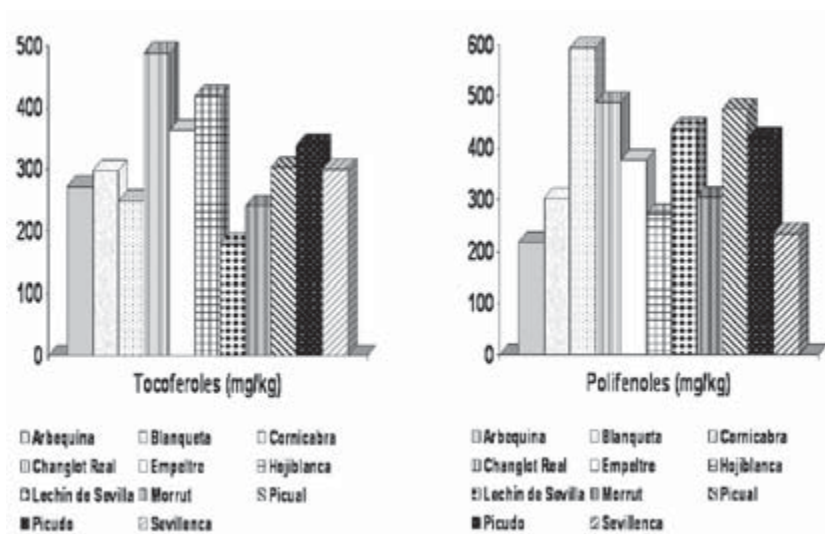


FIGURA 4. **Concentración de tocoferoles y polifenoles en once tipos de aceites monovarietales de amplio consumo en España. Tomado de Uceda (11).**

El sistema de extracción de aceite empleado es muy importante y condiciona su contenido en biofenoles. Los aceites obtenidos en decantadores de dos fases tienen unas concentraciones significativamente más altas en compuestos fenólicos y son por tanto más estables a la autooxidación y están relacionados con el sabor del aceite de oliva, y serían responsables, al menos en parte, de algunas propiedades organolépticas como frutado, dulce, amargo (10).

Para los profesionales y aficionados a la cata, el descubrir en un aceite de oliva sabores a manzana, a verde, a fresa, a naturaleza, es siempre una experiencia única, que abre puertas indecibles en la mente, en el tiempo y en el espíritu.

VALOR NUTRICIONAL DEL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es fuente de ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico (13). En el caso de ingerir 50 g/día de aceite de oliva en una dieta de 2.000 kcal, cubriríamos, si no totalmente, una buena parte de las necesidades de estos dos ácidos grasos esenciales (14). No sólo eso, el equilibrio entre los ácidos grasos de las familias omega-6 y omega-3 es mejor que el de otros muchos aceites consumidos en España.

El aceite de oliva es fuente de vitaminas liposolubles (13). Consumiendo 50 mL/día de aceite de oliva virgen se cubrirían entre el 55 y el 110% de las recomendaciones diarias de vitamina E (14). El cociente vitamina E/ácido linoleico en el aceite de oliva es de 2 mg/g; más alto que el de 0,6 mg/g sugerido como adecuado (14) y mejor que el de otros aceites vegetales.

Los aceites de consumo cotidiano son relativamente pobres en equivalentes de retinol (vitamina A); no obstante, el de oliva virgen tiene β -carotenos (0,6-1,3 mg/kg) (13). Consumiendo 50 mL/día de aceite de oliva virgen se cubrirían entre el 7,5 y el 15% de las recomendaciones diarias de equivalentes retinol (14).

El aceite de oliva tiene además un sinfín de compuestos (carotenoides, escualeno, fitosteroles, polifenoles, etc.) (Figura 3) con gran importancia bajo el punto de vista nutricional, gastronómica y organoléptica, ya que mantiene las características primigenias del aceite, frenando los procesos de autooxidación y enranciamiento.

Muchos compuestos de naturaleza fenólica aportan a los aceites sabores amargos y astringentes. Debido a la demanda por los consumidores, los aceites de oliva virgen y virgen extra que se comercializan en las grandes superficies son de sabores muy suaves, y por tanto con más bajo contenido en compuestos minoritarios y por ende, desgraciadamente, menor calidad nutricional.

EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN, MÁXIMO REPRESENTANTE DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

No es posible separar aceite de oliva de dieta mediterránea, ni dieta mediterránea de aceite de oliva. El aceite de oliva ha sido uno de los pilares básicos de la alimentación en la cuenca mediterránea. Sólo hasta el siglo XX no han aparecido en nuestra geografía, de forma significativa, otros aceites como los de semilla.

La visita del matrimonio Keys a Creta y posteriormente los resultados del estudio de los Siete Países (15) dieron lugar al reconocimiento mundial de los beneficios del consumo de una dieta rica en alimentos de origen vegetal, con obligado consumo diario y único de aceite de oliva. El concepto de dieta mediterránea, o mejor de dietas mediterráneas, se acuña definitivamente en una Conferencia organizada en Boston en 1993 por la «Harvard School of Public Health and the Oldways Preservation and Exchange Trust» y que definió el concepto de dieta mediterránea con una estructura piramidal. En la base de la pirámide junto a los cereales (pan, pasta) aparece el aceite de oliva (16).

La dieta mediterránea ha sido propuesta como modelo a seguir para una adecuada protección cardiovascular. La dieta mediterránea tradicional estaba basada principalmente en alimentos vegetales, contenía pequeñas cantidades de alimentos de origen animal, incluía pescado, lácteos y alcohol con moderación (principalmente en forma de vino y consumido durante las comidas) y aceite de oliva virgen era la principal fuente de grasa (Figura 5). Además dicha dieta implicaba mantener un equilibrio entre ingesta y gasto energético, mediante ejercicio moderado, siendo la comida un momento de esparcimiento, agradable y gratificante al compartir alimentos y sensaciones en familia.

El constituyente básico de la dieta mediterránea es, por tanto, el aceite de oliva, un aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados y con una concentración moderada en ácidos grasos saturados y poliinsaturados (Figura 2). Es más, no es entendible el concepto de dieta mediterránea fuera del aceite de oliva, aunque en algunos estudios se haya mimetizado la dieta mediterránea con otros aceites monoinsaturados. Esto es debido a que el aceite de oliva virgen

posee compuestos minoritarios únicos (por ejemplo, polifenoles) y la relación ácidos grasos poliinsaturados/antioxidantes parece más adecuada que la de otros aceites para prevenir la oxidación lipídica. En los aceites de oliva virgen y extra virgen se han definido biofenoles con propiedades antioxidantes muy importantes y con papeles en la modulación de la aterogénesis como luego se comentará.

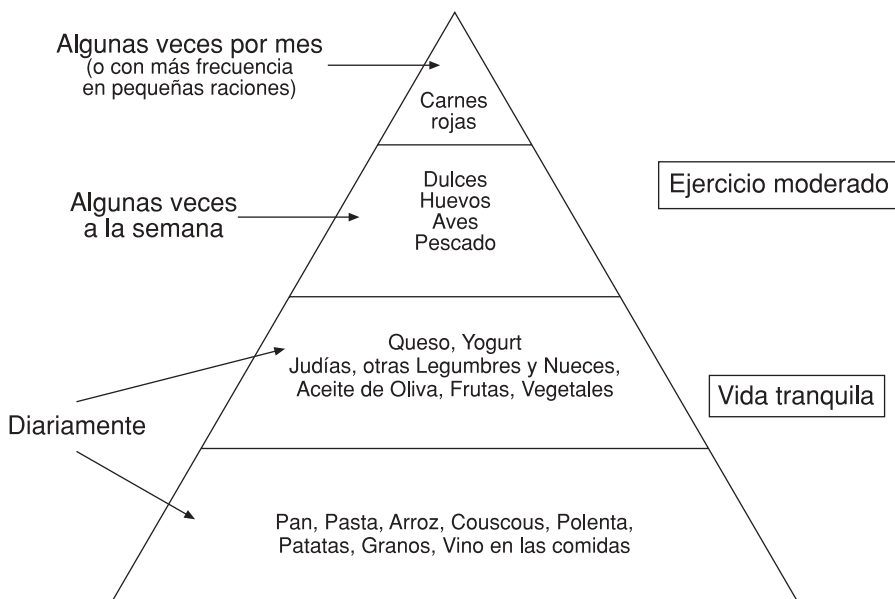


FIGURA 5. **Estructura piramidal de la dieta mediterránea clásica.**
 Las áreas del triángulo señalan de forma aproximada el tamaño y la contribución de los diferentes alimentos al total de la dieta durante un periodo de un mes de duración.

Por los datos publicados por algunas instituciones y equipos como el del profesor Varela, el consumo de aceite de oliva disminuyó de forma drástica en las últimas décadas y fue sustituido casi al 50% por el de otros aceites de semillas, mayoritariamente aceite girasol (17). Actualmente el consumo en España, según los datos de ENNA-3, es del orden de 33 g/cabeza/día (18), superior a la cantidad de aceite de oliva (dentro de una dieta baja en grasa saturada) señalada por el «Bureau Federal Americano (FDA)», para ejercer una protección cardiovascular significativa (19).

Pero no es entendible nuestra dieta sin hablar de su elaboración, y especial relieve tiene en la dieta mediterránea y en España la fritura (12, 20). No es separable dieta mediterránea de fritura. Entre los muchos usos que podemos imaginar, el aceite en crudo se emplea para ensaladas, «aceitado» del pan para desayuno o merienda, preparación de salsas, mayonesas, alioli, en la confección de gazpachos, salmorejos, etc. (20). En todas estas situaciones es razonable la utilización de un aceite con una composición equilibrada de ácidos grasos saturados/monoinsaturados/poliinsaturados y rico en componentes minoritarios, muchos de ellos antioxidantes y de reconocido papel beneficioso en la salud. Dependiendo del alimento a aderezar, se elegirán aceites de oliva de sabores suaves o aceites de sabores definidos y fuertes. Así, en crudo, los aceites más delicados, suaves, poco astringentes y nada picantes son una buena elección para aliñar ensaladas, verduras y pescados blancos hervidos o para preparar revueltos y cremas de verduras (20).

Los aceites frutados, más o menos fragantes y quizá algo amargos, potencian el sabor de los fritos, en especial de las patatas, y mejoran casi todos los sofritos y bases de estofados. Aquellos con un grado de frutamiento medio son muy adecuados en ensaladas e irremplazables en platos tipo escabeches, en salsa verde, o al pil-pil (20).

Durante la fritura tiene lugar la entrada de aceite al alimento modificando su textura, sabor y aspecto. Esto condiciona que el consumo de alimentos fritos sea una de las características de las dietas mediterráneas. Entre las ventajas de la fritura con aceite de oliva debe resaltarse la mejora en muchos casos del perfil de ácidos grasos saturados/monoinsaturados/poliinsaturados del alimento y el enriquecimiento del alimento en vitaminas liposolubles y compuestos antioxidantes. La fritura es un proceso que tiene lugar a unos 170-180° C, por lo que deben elegirse aceites lo más estables posible a los cambios térmicos y que nutricionalmente sean más recomendables (12, 20).

La fritura en sartén puede repetirse un número de veces no muy elevado, dado que la cantidad de aceite no suele ser mucha y las alteraciones en el aceite aparecen pronto. Utilizar aceite de oliva para freír en sartén hasta unas 4-5 veces puede ser una recomendación gastronómica y nutricional aceptable. La fritura en freidora utiliza mayor volumen de aceite, por lo que los productos de altera-

ción quedan más diluidos y permite por tanto un mayor número de frituras. Nuestros resultados sugieren que, en general, podría aconsejarse para freír diferentes tipos alimentos: 10 frituras con aceite de girasol y algo menos de 30 con aceite de oliva. Estos números podrían incrementarse en función de la capacidad de la freidora y de la fritura de alimentos magros (12, 20).

La adición de aceite «sin usar» a la freidora (añadir después de cada uso el aceite que han adsorbido los alimentos) es una maniobra positiva desde el punto de vista nutricional y ampliamente corroborada por nuestro equipo, fundamentalmente por los trabajos del Doctor Romero y de la Doctora Bastida (12).

EFFECTOS BENEFICIOSOS DEL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA

Son muchas las investigaciones que durante las últimas décadas se han llevado a cabo sobre los beneficios para la salud derivadas del consumo de aceite de oliva. A mí me gustaría hacer desde aquí un homenaje al Profesor Mataix por los dos volúmenes de su magnífico libro «Aceite de oliva virgen, nuestro patrimonio alimentario» (21); y a los Profesores Quiles y Rodríguez-Tortosa de la Universidad de Granada por otro magnífico libro «Olive Oil and Health» (22). En ambos he tenido el honor de participar y en ellos se recogen muchos aspectos actuales del beneficio de este *oro verde*.

Relación aceite de oliva y envejecimiento

Hace meses, en Madrid, nos reunimos más de veinte expertos en aceite de oliva y en diferentes campos de la salud (23). En aquella reunión se discutieron muchos aspectos y se emitieron las siguientes conclusiones:

1. La evidencia publicada muestra que el aceite de oliva virgen, dentro del contexto de la dieta mediterránea, puede prevenir el deterioro cognitivo relacionado con la edad y la demencia.

La doctora Benedí, en su presentación como Académica Correspondiente en esta Academia, nos hablaba de los beneficios de algu-

nos compuestos en algunos vegetales sobre enfermedades degenerativas cerebrales (Parkinson y Alzheimer) (24). Nuestro cerebro es muy sensible a variaciones en el contenido de ácidos grasos en la dieta y al estrés oxidativo. Particularmente interesante es el papel que el aceite de oliva puede realizar en la incorporación de otro ácido graso, el docosahexaenoico, y en la limitación del exceso de araquidónico a los sinaptosomas y a otros dominios de membrana de neuronas y neuroglía (25). La incorporación de componentes minoritarios (β -carotenos, carotenoides) ayudaría también a mantener bajo el riesgo de lipo-peroxidación y daño al DNA en estas células de áreas vitales de nuestra economía.

2. La evidencia actual sugiere que la dieta mediterránea, rica en ácido oleico y en antioxidantes, se asocia con un aumento significativo de la supervivencia y la longevidad.

A este respecto son clarísimos los datos de los estudios SÉNECA (24) y HALE (25) realizados en ancianos. El estudio SENECA es un Estudio de cohortes longitudinal en el que participaron 2.600 personas de más de setenta años de edad. El seguimiento mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier señaló que los ancianos de países de sur de Europa presentaban con mucho la mayor supervivencia, respecto a sus equivalentes del norte y este europeos (Figura 6). Son muchos factores los que contribuyen a esta mayor super-

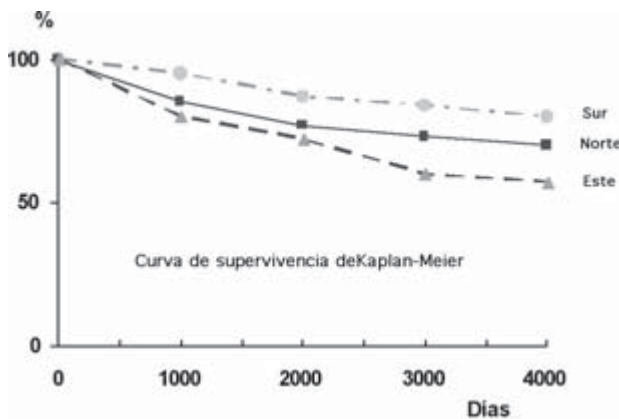


FIGURA 6. *Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en 2.600 participantes de más de setenta años del estudio SENECA y pertenecientes a diferentes zonas de Europa. Adaptada de Groot y col. (26).*

vivencia, pero entre otros se encuentra el estilo de vida (siesta, menor stress, consumo de dietas tipo mediterráneas) y ciertos marcadores de morbi-mortalidad (por ejemplo, menores niveles de colesterol en suero, etc.).

Relación entre aceite de oliva y aterosclerosis

La aterosclerosis se considera hoy un proceso inflamatorio que se desarrolla por la interacción entre las lipoproteínas, la pared arterial y los componentes celulares de la sangre (plaquetas, monocitos y linfocitos) (28, 29).

Actualmente está establecido que el aceite de oliva tiene un papel preventivo y beneficioso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Los efectos se atribuyen mayoritariamente a su elevado contenido en ácido oleico y moderado de ácido linoleico y más modernamente a los compuestos minoritarios.

De obligada cita es el «Estudio de los Siete Países (Seven Countries Study)» (15) realizado en cerca de 11.600 hombres de mediana edad de siete países: Estados Unidos de Norteamérica, Finlandia, Grecia, Holanda, Italia, Japón y Yugoslavia. Su objetivo fundamental era conocer las características (ambientales y de estilo de vida) de las dieciséis cohortes —mediterráneas y no mediterráneas— participantes y su relación con la morbi-mortalidad por enfermedad cardiovascular.

Las cohortes mediterráneas consumían dietas ricas en alimentos vegetales: aceite de oliva, cereales, frutas, vegetales frescos. Bebían vino durante las comidas. En las cohortes no-mediterráneas, la carne y la leche eran las principales fuentes de grasa, y la cerveza y bebidas alcohólicas de alta graduación se tomaban entre comidas. Las cohortes mediterráneas tenían ingestas bajas (% al total de la ingesta energética) de ácidos grasos saturados y cocientes ácidos grasos monoinsaturados/saturados mayores de 2 (Figura 7). Los resultados del «Estudio Siete Países» son muy claros y han servido entre otros aspectos para marcar los *Objetivos Nutricionales* en muchos países (por ejemplo, <7% de las kcal totales de la dieta deben proceder de los ácidos grasos saturados, la dieta debe tener cociente ácidos grasos monoinsaturados/saturados mayor de 2).

Otro aspecto diferencial de las cohortes mediterráneas era el gozar de la comida en familia y el disfrutar de una vida no estresante y activa. La tasa de mortalidad cardiovascular después de quince años señala la bondad de la dieta consumida por las cohortes mediterráneas para prevenir las enfermedades cardiovasculares típicas de los países industrializados (Figura 7).

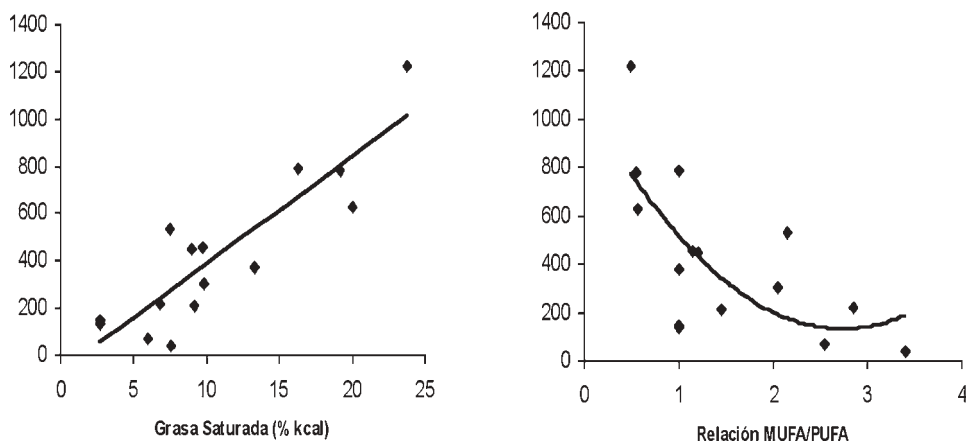


FIGURA 7. *Datos epidemiológicos relacionando el porcentaje de kcal grasas de las dietas consumidas con mortalidad cardiovascular. En la figura de la izquierda se muestra la relación entre kcal (%) de grasas saturadas y mortalidad cardiovascular. En la figura de la derecha se indica que el cociente de ácidos grasos monoinsaturados/saturados (MUFA/SFA) se relaciona de forma inversa con las tasas de mortalidad cardiovascular en el estudio de los Siete Países. Adaptado de Keys y col. (15).*

Los resultados del estudio SENECA (26) señalan en ancianos que los niveles de colesterol plasmático se corresponden con el tipo de grasa ingerida, siendo menor en aquellas cohortes de personas de edad con consumos más elevados de ácidos grasos monoinsaturados. La cohorte de Betanzos, que seguía un patrón dietético mediterráneo, tenía niveles de colesterol que se encontraron dentro de los más bajos de los estudio (la cuarta de 18 cohortes testadas).

Después de los resultados de Keys y col. (15), que sugieren que el aceite de oliva y los MUFA son el factor clave en la protección cardiovascular, únicamente algunos estudios prospectivos tipo co-

horte han llegado a posteriores hipótesis. De esos, algunos han sido realizados en el área mediterránea (30-35). Otros se han realizado en países donde el uso de aceite de oliva es muy limitado y las fuentes de ácidos grasos monoinsaturados son a menudo diferentes del aceite de oliva y ricas en ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans*. A la inversa, en el área mediterránea, el aceite de oliva obtenido por técnicas para asegurar la preservación del contenido de vitaminas y compuestos fenólicos es la principal fuente de ácidos grasos monoinsaturados. En la mayoría de los estudios prospectivos tipo caso-control, que no encuentran un claro efecto protector para el aceite de oliva, tienen un fallo en el diseño (29). En la Tabla 2 se resumen algunos estudios donde se demuestran los efectos beneficiosos del consumo de una dieta tipo mediterránea. Así en el estudio CARDIO 2000 se estudió una muestra de 661 pacientes de mediana edad que habían padecido un primer evento de infarto de miocardio o de *angor pectoris* inestable frente a un grupo control de 661 individuos de diferentes áreas de Grecia. Los investigadores señalan que la adopción de una dieta mediterránea estuvo relacionada con una reducción ajustada estadísticamente del 16% en el riesgo de sufrir un primer evento de síndrome agudo coronario (30). Además en un subestudio del CARDIO2000 y después de tener en cuenta los efectos de muchos factores de confusión, los investigadores señalaron que la adopción de una dieta mediterránea estuvo asociada con 7-10% de reducción en el riesgo coronario en sujetos hipertensos tratados y no tratados farmacológicamente (32).

Cuando los investigadores del estudio CARDIO2000 examinaron un grupo de hipercolesterolémicos que siguieron la dieta mediterránea se encontró una disminución del riesgo coronario independiente de los niveles de colesterol y de otros factores de riesgo (31).

Finalmente, los mismos investigadores (33) definieron que la adopción de un patrón de dieta mediterránea estuvo asociada con una disminución del 35% de riesgo coronario en un subgrupo de sujetos con síndrome metabólico, después de ajustar estadísticamente para edad, sexo, nivel económico y educacional, y para los factores de riesgo convencionales.

Recientemente en un estudio prospectivo en una población de más de 22.000 adultos griegos de la cohorte del estudio EPIC se

encontró una asociación inversa de mortalidad cardiovascular y adherencia a la dieta mediterránea. Es interesante que dicha asociación se encontró sólo en los pacientes de más de cincuenta y cinco años, lo que sugiere que la asociación encontrada es debida a exposición acumulada a la dieta mediterránea (34).

TABLA 2. *Resumen de algunos estudios que señalan los efectos de la dieta mediterránea en la enfermedad cardiovascular*

<i>Estudio</i>	<i>Población</i>	<i>Tipo de Estudio</i>	<i>Resultado/ Consecuencia</i>	<i>Odds ratio o riesgo relativo</i>
Panagiotakos y col. (30) CARDIO 2000	661 con SAC y 661 controles	Caso-control	Primer evento de SAC	0,84 (0,73-0,96)
Pitsavos y col. (31) CARDIO 2000	534 con SAC y 399 controles con hipercolesterolemia	Caso-control	Primer evento de SAC	0,88 (0,82-0,94)
Pitsavos y col. (32) CARDIO 2000	418 con SAC y 303 controles con hipertensión	Caso-control	Primer evento de SAC	0,92 (0,85-0,98)
Pitsavos y col. (33) CARDIO 2000	307 con SAC y 198 controles con síndrome metabólico	Caso-control	Primer evento de SAC	0,64 (0,44-0,95)
Trichopoulou y col. (34) EPIC	22.034 hombres y mujeres adultas	Población basada en prospección	Fatal CHD	0,67 (0,47-0,94)
Martínez-González y col. (35)	171 con IAM y 171 controles con hipercolesterolemia	Caso-control	Primer evento de IAM	0,55 (0,42-0,73)

Datos que corresponden al cociente Odds y entre paréntesis a los límites de seguridad estadística al 5 y al 95%. CHD: enfermedad cardiovascular; IAM: infarto agudo de miocardio; SAC: síndrome agudo coronario.

Martínez-González y col. (35) señalan que a mayor seguimiento de la dieta mediterránea (medido mediante adhesión al tipo de dieta o *score*) presentaban menor riesgo relativo de infarto de miocardio (Tabla 2). No obstante, estos últimos autores proponen se excluya a los cereales refinados con alto índice glucémico del concepto de dieta mediterránea.

Los resultados del estudio de prevención secundaria «Lyon Diet Heart Study» (36), señalan una reducción extraordinaria del 70% de riesgo de eventos coronarios y son altamente sugerentes. Este estudio fue diseñado en pacientes que ya habían tenido un infarto agudo de miocardio. 605 pacientes de ambos sexos se enrolaron en él. Los pacientes controles siguieron la dieta prudente paso I de la «American Heart Association», mientras que los del grupo experimental adoptaron una dieta mediterránea. La composición de la dieta de este grupo recordó a la de la dieta de Creta en los años cincuenta y principios de los sesenta del estudio «Seven Countries» (15). Después de sólo 27 meses se había observado ya una reducción de eventos coronarios y de muerte cardiovascular muy elevada cuyos beneficios continuaban a los 46 meses.

Gil, Mata, Oya, Pérez Jiménez, entre otros, en España, Matson y Grundy, Kris-Etherton en USA, Katan y otros en Holanda, señalan que el consumo de aceite de oliva lleva a un perfil lipídico favorable, reduce los mecanismos inflamatorios, disminuye la presión arterial, incrementa la vasodilatación arterial, disminuye la fibrinólisis y la trombosis y mejora el metabolismo de los hidratos de carbono en la Diabetes Mellitus tipo 2 (37-42).

Particularmente interesantes son los datos de Mata y col. (43), quienes encuentran un incremento del contenido de oleico en la fracción de ésteres de colesterol en voluntarios que consumían aceite de oliva (Tabla 3). Posteriormente estos mismos autores encontra-

TABLA 3. *Cambios de la composición de ácidos grasos de los ésteres de colesterol de las LDL durante diferentes periodos dietéticos*

Ácidos grasos	SATURADO	MUFA	PUFA n-6	PUFA n-3
16:0	11,7 ± 1,8	11,0 ± 1,8	9,5 ± 1,5	10,1 ± 1,5
18:1 n-9	20,1 ± 2,1	27,1 ± 2,9	13,5 ± 1,8	13,7 ± 1,3
18:2 n-6	52,5 ± 3,2	45,4 ± 3,0	62,9 ± 2,6	60,7 ± 2,9
20:5 n-3	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,3	3,1 ± 1,2
22:6 n-3	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,1 ± 0,6	1,5 ± 0,5

MUFA: Periodo dietético rico en ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: Periodo dietético rico en ácidos grasos poliinsaturados. Tomado de Mata y col. (43).

ron que dichas LDL enriquecidas en ácido oleico eran menos susceptibles de peroxidación que las LDL de los mismos voluntarios que consumían aceite de girasol (44).

Mi equipo de investigación no ha sido ajeno al estudio de las virtudes del aceite de oliva en el metabolismo lipoproteico y riesgo aterogénico. En una población de religiosas de clausura con riesgo cardiovascular incrementado, fuimos sustituyendo en su dieta el aceite durante cuatro periodos de un mes, manteniendo constante el aporte de otros alimentos. Esta población seguía hábitos de consumo clásicos mediterráneos. El periodo dietético que indujo niveles de colesterol y LDL-colesterol más reducidos fue el de aceite de oliva virgen extra, seguido por el de aceite de girasol con alto contenido en ácido oleico y de la mezcla aceite de girasol y aceite de oliva y muy de lejos por la oleína de palma (45, 46) (Figura 8).

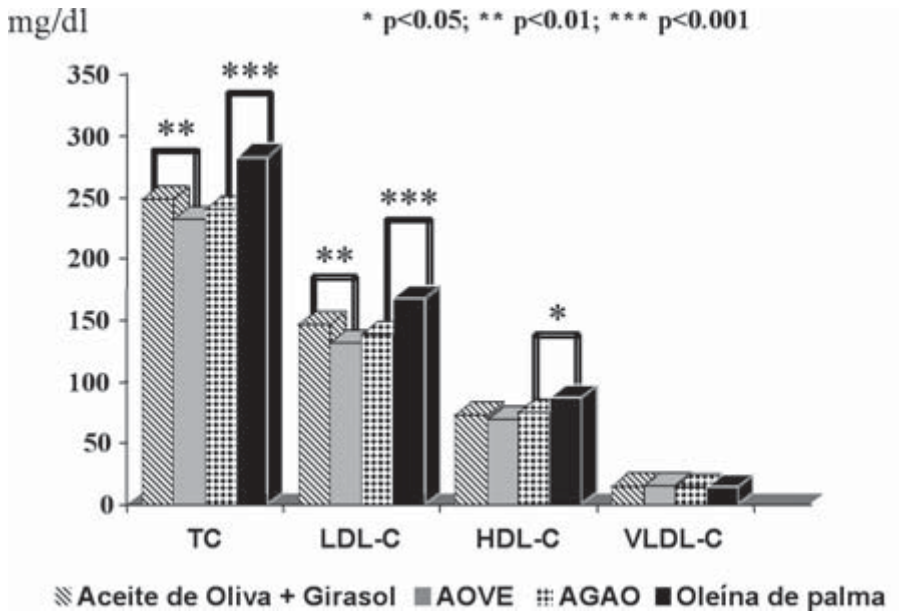


FIGURA 8. Niveles de colesterol en suero y en lipoproteínas en mujeres posmenopáusicas que consumían dietas en las que se modificó la grasa culinaria manteniendo la cantidad de aceite. AOVE: aceite de oliva virgen extra; AGAO: Aceite de girasol alto oleico. Fuente: Ródenas y col. (45) y Cuesta y col. (46).

También observamos que la mayor ingesta de ácidos grasos monoinsaturados originó la menor concentración de apolipoproteína AII en las HDL (47), aspecto que sugiere un transporte reverso de colesterol más eficiente. En un estudio piloto en la misma población de clausura encontramos una menor agregación plaquetaria inducida por estimulación con ADP durante el periodo que recibieron como única grasa culinaria aceite de oliva virgen extra frente al periodo con otro aceite monoinsaturado el aceite de girasol con alto contenido en ácido oleico (47) (Figura 9). Los efectos diferenciales se relacionaron fundamentalmente con el contenido de polifenoles y otros compuestos minoritarios. Debo reconocer que el estudio en este grupo de religiosas ha sido uno de los más importantes de mi carrera investigadora y, probablemente, el más gratificante.

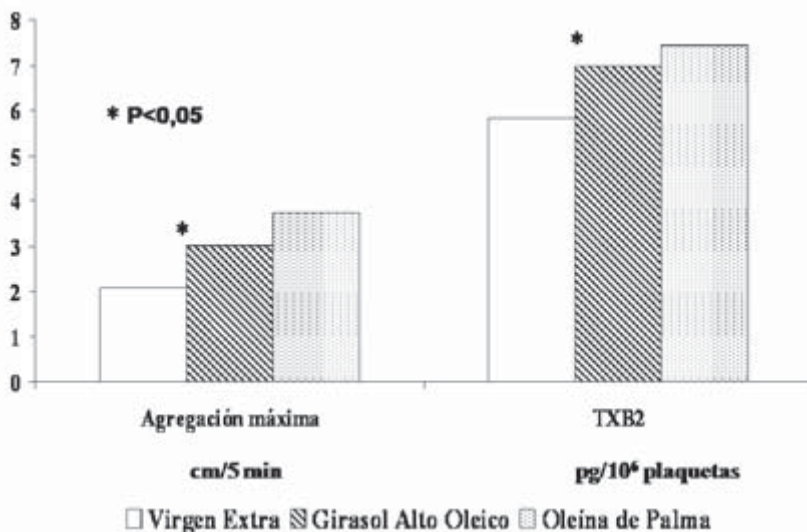


FIGURA 9. *Agregación plaquetaria máxima y niveles de tromboxano B2 en mujeres posmenopáusicas que consumían dietas en las que se modificó la grasa culinaria manteniendo constante la cantidad de aceite y el contenido de alimento. *Diferencias significativas (ANOVA) entre periodos. Fuente: Sánchez-Muniz y col. (48) y Oubiña y col. (51).*

Los mecanismos por los que el aceite de oliva puede ejercer su efecto sobre otros muchos aspectos implicados en la enfermedad arterial no son totalmente conocidos, pero se sugiere que deben estar relacionados con la producción de diferentes eicosanoides de-

rivados de los ácidos araquidónico y eicosapentanoico. El consumo de aceite de oliva contribuye a una menor ingesta de ácido linoleico y por tanto a un menor contenido de ácido araquidónico en la mayoría de las membranas celulares (49).

Boskou y Visioli, entre otros muchos, han señalado que los polifenoles del aceite de oliva virgen y virgen extra se absorben y son biodisponibles (50). Así, el tirosol y otros polifenoles se incorporan a las LDL. El hidroxitirosol actúa como potente «scavenger» para sustancias reactivas al oxígeno; la oleuropeína reduce la expresión de factores de adhesión de monocitos al endotelio vascular, e inhibe la producción de tromboxano A2 (50).

Nuestro grupo publicó hace seis años en la prestigiosa revista *British Journal of Nutrition* (51) un estudio en las religiosas a las que me he referido antes, comparando el efecto del aceite de oliva virgen extra con el del aceite de girasol con alto contenido en ácido oleico. Los dos aceites son muy ricos en ácido oleico, pero difieren marcadamente en el contenido de compuestos menores. El aceite de oliva contiene polifenoles, el de girasol, con alto contenido en ácido oleico, no. El aceite de oliva es más pobre en tocoferoles y en algunos fitosteroles, aunque más rico en delta-5 avenasterol, escualeno, uvaol, etc. Los efectos de ambos aceites sobre la peroxidación en suero fueron equivalentes. No obstante, el aceite de oliva virgen extra produjo menor agregación plaquetaria *in vitro* (48) y de producción de tromboxano A2, medido como tromboxano B2 (51) (Figura 9).

Los estudios «DART» (52), «Lyon Diet Herat» (36), «GISSI-P» (53) han demostrado claramente que la inclusión en la dieta de aceite de oliva, en el marco de una dieta mediterránea, eleva adicionalmente la protección cardiovascular ejercida por la terapia con estatinas en el 20-30%.

También el «EUROLIVE STUDY GROUP» comandado por la Doctora Isabel Covas, realizado en 200 varones sanos de cinco países indica los beneficios del consumo de aceite de oliva virgen rico en compuestos polifenólicos en poblaciones en las que se respeta sus hábitos de vida (54). Siguiendo un diseño cuadrado latino, doble ciego, con lavado y tres concentraciones de polifenoles, dichos autores encuentran efectos significativos y positivos de la dosis de los polifenoles sobre diferentes marcadores de riesgo cardiovascular y

peroxidación de las lipoproteínas (Tabla 4). Este estudio no hace más que confirmar los resultados previos obtenidos en una comunidad de religiosos varones que fue publicado hace tres años por la misma Doctora Covas y su grupo (55).

TABLA 4. *Efecto del consumo de aceites de oliva virgen con diferente contenido de polifenoles en 200 voluntarios sanos procedentes de cinco países enrolados en el Euroolive Study Group*

	<i>Bajo contenido 2,7 mg polifenoles/kg</i>	<i>Contenido medio 164 mg polifenoles/kg</i>	<i>Alto contenido 366 mg/ polifenoles/kg</i>
Triglicéridos	Desciende 0,05 mmol de media en los tres grupos		
HDL-colesterol	↑ 0,025 (0,003-0,05)	↑ 0,032 (0,005-0,05)	↑ 0,045 (0,02-0,06)
Colesterol total/HDL-colesterol	Desciende de forma lineal al aumentar el contenido de polifenoles en el aceite		
LDL-Oxidadas	1,21 (0,8-3,6)	-1,48 (-3,6 a 0,6)	-3,21 (-5,1 a -0,8)

Los valores son la media y el intervalo de confianza estadístico (percentiles 5 y 95). Tomado de Covas y col. (54).

El grupo de Valentina Ruiz-Gutiérrez del Instituto de la Grasa y Derivados de Sevilla ha publicado los posibles mecanismos por los que el aceite de oliva y sus componentes son capaces de acallar la formación de radicales libres, la activación del sistema ciclooxigenasa y lipooxigenasa, la producción de Prostaglandina E2, la riqueza de NFκB, la producción de interleuquinas, de TNFα, de moléculas de adhesión de monocitos, etc. (56). Instamos muy enfáticamente a la lectura de dicho trabajo.

En el Encuentro científico «Estado de los conocimientos sobre aceite de oliva, la nutrición y la salud», realizado en Madrid en marzo de 2005 (23) concluíamos:

1. Cuando el aceite de oliva sustituye a una dieta rica en grasa saturada, reduce los niveles plasmáticos de LDL-colesterol y mejora la relación LDL/HDL aterogénica.

2. Reduce los triglicéridos plasmáticos y aumenta los niveles de HDL-colesterol, en comparación con una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono.
3. Mejora el metabolismo lipoproteico postprandial.
4. Cuando sustituye a una dieta rica en PUFA, reduce la susceptibilidad de las LDL a la modificación oxidativa.
5. Mejora la vasodilatación endotelial y la respuesta inflamatoria.
6. Reduce la agregación plaquetaria, la activación postprandial del factor VII de la coagulación y los niveles plasmáticos del inhibidor del plasminógeno (PAI-I).
7. Mejora el metabolismo de los hidratos de carbono en pacientes con diabetes tipo-2.
8. Reduce la presión sanguínea y el riesgo de hipertensión.
9. No favorece la obesidad y aumenta la actividad lipolítica del tejido adiposo y la actividad de la UCP-2.

Relación entre aceite de oliva y cáncer

Cáncer es un término, que según García Muriana (57), engloba a una gran cantidad de condiciones patológicas caracterizadas por un crecimiento desordenado e incontrolado de células que pueden invadir y destruir tejidos y extenderse. El desarrollo del cáncer depende del funcionamiento del «ciclo celular». Este proceso universal se regula en células humanas por activación/inactivación secuencial de proteínas denominadas «quinasas dependientes de ciclinas» y consta de interfases y mitosis, donde se regula la actividad metabólica, la capacidad de síntesis, el tamaño celular, las condiciones de mitosis. La precisión con la cual el ciclo celular se ejecuta posibilita que los organismos vivos se reproduzcan, pero aumenta la inestabilidad de la información genética almacenada en nuestro genoma, con pérdida de control del crecimiento celular (57).

La relación del consumo de aceite de oliva y el cáncer es mucho menos conocida y ha despertado gran interés reciente. No obstante,

epidemiológicamente, se ha observado una menor incidencia de muertes totales por todo tipo de cáncer y cáncer de colon en países mediterráneos en comparación con otros del Norte de Europa o Estados Unidos (58) (Figura 10). Esto es especialmente interesante teniendo en cuenta que la ingesta media de grasa es superior en los países mediterráneos. Dilucidar el papel exacto que la grasa ejerce en la instauración y progresión del cáncer es difícil en humanos, ya que numerosos factores dietéticos pueden estar relacionados aumentando o disminuyendo el riesgo de cáncer y su severidad. Además la ingesta de factores pro- y anti-cancerígenos puede efectuarse simultáneamente, haciendo aún más difícil conocer el papel de cada compuesto o alimento en la enfermedad tumoral (59).

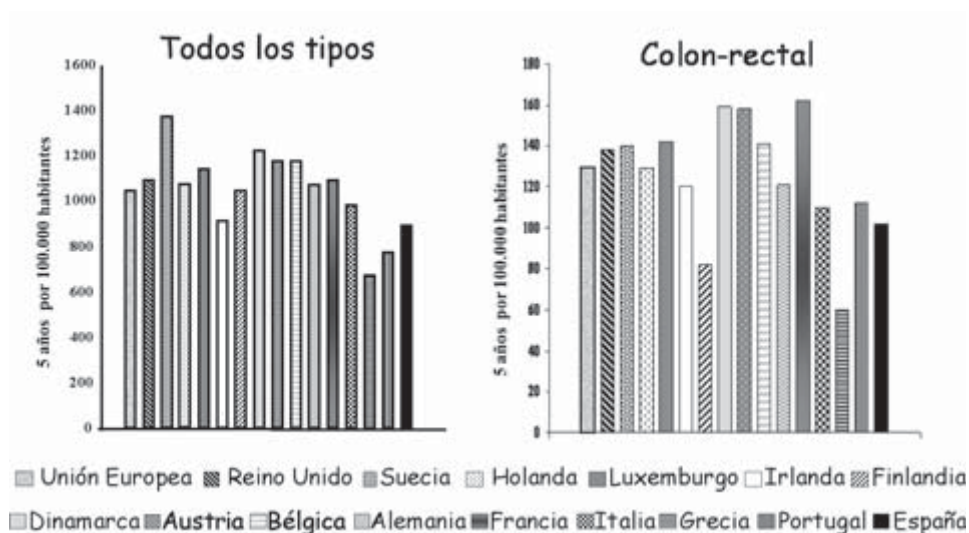


FIGURA 10. *Incidencia de todos los tipos de cáncer y de cáncer colon-rectal en diferentes países de la Comunidad Europea.*

Adaptada de Quiles Morales y col. (59).

En el encuentro científico: «Estado de los conocimientos sobre aceite de oliva, la nutrición y la salud», celebrado en Madrid en marzo de 2005 (23), concluimos respecto al aceite de oliva y cáncer:

1. La grasa total no es el factor clave en la carcinogénesis humana, siempre y cuando exista un buen equilibrio entre ingesta energética y gasto energético.

2. La fuente y el tipo de grasa desempeñan un papel fundamental en la carcinogénesis humana.
3. El consumo de aceite de oliva y de pescado se asocian con una reducción de cáncer, a diferencia de los aceites ricos en ácido linoleico y posiblemente los alimentos ricos en grasa saturada.

Además en modelos animales y líneas celulares humanas (21):

- a) Se ha demostrado específicamente el efecto anticarcinogénico del aceite de oliva y de sus componentes ácido oleico y compuestos minoritarios.
- b) Los mecanismos que pueden estar implicados en la prevención del cáncer tras consumir aceite de oliva son: Modificación de la respuesta genética, modulación de la cascada inflamatoria oxidativa, inducción de apoptosis, control de la proliferación celular, cambios en la estructura y la función de las membranas celulares.
- c) Se ha obtenido evidencia experimental sobre los efectos beneficiosos del aceite de oliva en diferentes fases de la carcinogénesis, incluida la iniciación, promoción y progresión.

Así en la fase de iniciación, los procesos oxidativos son fundamentales (58-60). La generación de radicales libres se ve condicionada de manera crucial por el contenido de ácidos grasos insaturados. El ácido oleico se calcula que se oxida del orden de cuarenta veces menos que el ácido linoleico mayoritario en otros aceites vegetales. Además el aceite de oliva, como ya hemos indicado, es rico en componentes minoritarios de naturaleza antioxidante, tales como vitamina E, polifenoles, etc. Por ello habrá que considerar que no sólo es importante la inclusión de aceite rico en oleico, sino la presencia de muchos otros compuestos que aparecen en los aceites vírgenes, pero no en los refinados o en los aceites vírgenes y vírgenes extra de sabores suaves.

Algunos estudios *in vitro* señalan que el hidroxitirosol bloquea en gran medida los efectos lesivos del peróxido de hidrógeno sobre el ADN de células epiteliales de próstata (61) (Figura 11). El escualeno actúa como «scavenger» sobre radicales libres y disminuye el creci-

miento de células tumorales (62). Los lignanos, componentes minoritarios del aceite de oliva, parecen tener acción antiestrogénica, debido a su similitud estructural con el estradiol y el antiestrogénico de síntesis el tamoxifeno. Los lignanos se ha demostrado son capaces de inhibir la proliferación inducida por estradiol de las células MCF-7 del carcinoma humano de mama (63).

Numerosos estudios han concluido que el tipo de grasa dietética tiene gran importancia en las fases de promoción y progresión del cáncer (64). Así cuando la dieta contiene niveles elevados de ácidos grasos saturados, se suprime el desarrollo de tumores mamarios que ocurre en tumores iniciados mediante ingestas elevadas de ácidos grasos poliinsaturados n-6 (p. ácido linoleico). Si se suplementa la grasa saturada con ácidos grasos poliinsaturados n-6, se pierde el efecto supresor del crecimiento de células tumorales debido a los ácidos grasos saturados (65), igualando el crecimiento tumoral al encontrado con las dietas poliinsaturadas n-6.

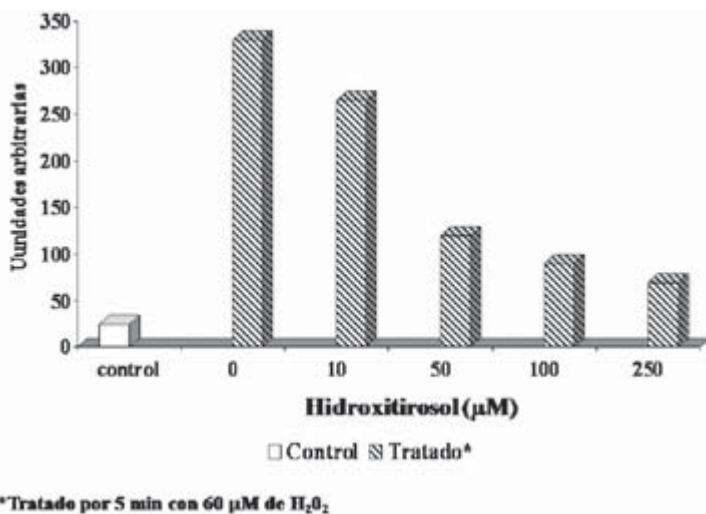


FIGURA 11. *Efecto de la adición creciente de hidroxitirosol a cultivos de células epiteliales de próstata. Adaptado de Quiles y col. (61).*

Datos bien contrastados sugieren que se requiere una proporción del 4% de ácido linoleico en peso para que se produzca una promoción eficaz de los tumores de mama en ratas (59). Los efectos de los

ácidos grasos monoinsaturados en la fase de promoción son controvertidos, habiéndose definido ausencia de efecto (64) o papel supresor (59). Respecto a la etapa de metástasis, se acepta en general que el grado de metástasis se incrementa a medida que se eleva la concentración de ácido linoleico en la dieta (59).

Los mecanismos bioquímicos y moleculares exactos a través de los cuales la dieta puede alterar la promoción y progresión del cáncer no están aclarados, si bien se relacionan con modificaciones en la respuesta inmune, en la generación de hormonas, metabolismo energético, producción de interleucinas, eicosanoides, etc. (58, 59). Los productos de la peroxidación lipídica son fundamentales, teniendo efectos deletéreos en las fases de promoción y progresión, posiblemente ligado a modificaciones en la defensa global; si bien se acepta que no se trataría de daño directo a estructuras o funciones celulares —como ocurre en la iniciación— sino influenciando la señal intracelular a través de moléculas originadas por acción de los radicales libres. Dado que el aceite de oliva genera menos compuestos peroxidativos es de concluir que potenciará el crecimiento tumoral en menor medida que otros aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados n-6.

Durante la fase de metástasis, para acelerar la dispersión de las células cancerígenas hacia el de la sangre hace falta que se produzca la desintegración del tumor (66). Para ello debe producirse la inhibición de moléculas de adhesión celular (por ejemplo, E-caderinas). Se ha sugerido que el papel de la grasa (aceite de oliva) en los procesos de metástasis debe estar ligado a modificaciones en la expresión génica de moléculas de adhesión tumoral y endotelial (59).

Los eicosanoides son mensajeros celulares derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono (por ejemplo, araquidónico, eicosapentaenoico, eicosatrienoico) que se encuentran implicados en la regulación de la función celular. Entre otros aspectos merece destacarse el papel de los eicosanoides en el crecimiento del tumor y su desarrollo, aunque no parecen estar implicados en la fase de iniciación. Particular importancia tiene la prostaglandina E2 (PGE2), dado que niveles elevados de esta prostaglandina se han relacionado con el aumento del crecimiento tumoral (67). Dado que una ingesta incrementada de ácido oleico implicaría un menor con-

sumo de ácido linoleico, con incorporación global de menores cantidades de ácido araquidónico (derivado del linoleico) en los fosfolípidos de la célula tumoral. Ante diferentes estímulos, la célula tumoral enriquecida en ácidos grasos de la familia n-9 generaría menos PGE2. Igualmente los aceites de semilla poseen mayor efecto angiogénico, con lo que una sobreproducción de eicosanoides de la serie del linoleico potenciaría los efectos de crecimiento tumoral (57-67).

La lectura del capítulo de revisión sobre aceite de oliva y otros lípidos dietéticos en el cáncer de Escrich y col. (58) en el libro «Olive Oil and Health» es enteramente recomendable, dado la amplitud de información que presenta. Tremendamente importante es conocer que en todas las fases de desarrollo de cáncer, la célula tumoral tiene en todas sus fracciones lipídicas una riqueza menor de ácido oleico y mayor de ácido linoleico, que es precursor de ácido araquidónico y éste a su vez de eicosanoides (por ejemplo, PGE2) que estimulan el crecimiento de las células tumorales (60). El enriquecimiento en ácido oleico causa cambios profundos en la estructura y funcionalidad de células cancerosas (58, 59).

Escrich y col. (58) señalan que el efecto protector del aceite virgen extra se logra, al menos en parte, mediante modulación génica a través de disminuir los niveles del p21-Ras-GTP y de cambios en la expresión de los genes de la familia erbB. También, en células tumorales hormono-dependientes, el aceite de oliva genera patrones hormonales que, respecto a otros aceites, no estimulan los procesos cancerígenos (58).

Son muy claros los efectos positivos de interacción entre fármacos antitumorales y aceite de oliva que no aparecen cuando se consumen otros aceites (57). Los ácidos grasos omega-3 y el ácido oleico son capaces de potenciar la citotoxicidad de fármacos antitumorales como el paclitaxel (67), la cerulenina y la genisteína en el cáncer de mama (57), el cisplatino en la metástasis de pulmón (68), y la vincristina en el carcinoma de cuello de útero (57).

OBJETIVOS NUTRICIONALES. OTRAS RECOMENDACIONES

Por último, me gustaría terminar esta revisión con una recomendación: Así, cuando se utiliza aceite de oliva como única grasa culinaria y se consume grasa de forma moderada en el marco de una dieta mediterránea clásica, es relativamente fácil cumplir los objetivos nutricionales de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (69) y otras entidades científicas (13):

1. No exceder el 10% del valor energético de la dieta en forma de grasa saturada, siendo muy aconsejable que su ingesta se reduzca al 7%.
2. Los ácidos grasos monoinsaturados deben ser mayoritarios en nuestra dieta y constituir entre el 15 y el 20% de la energía total.
3. Los ácidos grasos poliinsaturados no deben superar el 5% del contenido calórico de la dieta, dada su mayor sensibilidad a la oxidación.
4. El equilibrio entre los ácidos grasos omega 6/omega-3 debe estar entre 4:1 y 10:1.

Los tres últimos aspectos no se conseguirían nunca con una dieta elaborada con aceites de semillas.

Yo quisiera terminar este trabajo con otra sugerencia, que ustedes visiten las rampas altas del Jardín Botánico de Madrid para familiarizarse con algunas variedades de olivos; que se pierdan en el centro de Mallorca entre los olivos centenarios, que visiten la tierra andaluza, que vayan a las Guerrigues, al bajo Aragón o los olivares de Toledo. Es todo un espectáculo inolvidable que ayuda a pensar y a amar, que hace que recitemos y nos preguntemos como lo hacía Miguel Hernández: «Andaluces de Jaén, Aceituneros altivos, decidme en el alma ¿de quién?, ¿de quién son estos olivos?»

En el *Libro de los Jueces* encontramos una cita maravillosa: «Pusiéronse en camino árboles para unguir un rey que reinase sobre ellos y dijeron al olivo: Reina sobre nosotros. Contestoles el olivo: “¿Voy yo a renunciar a mi aceite, que es mi gloria ante Dios y ante los hombres, para ir a mecerme sobre los árboles?”».

Y nada más agradecer de nuevo a la Real Academia Nacional de Farmacia la oportunidad de escribir en sus Anales sobre un tema tan nuestro, tan moderno, tan actual y tan de siempre: «Las virtudes del aceite de oliva como clave de vida en la Cuenca Mediterránea».

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia, proyecto AGL 2005-7204-C02-01/ALI. Gracias a todos aquellos y fundamentalmente al Profesor Gregorio Varela Mosquera y a la Doctora Carmen Cuesta Lorenzo, que hicieron posible mis investigaciones sobre las propiedades del aceite de oliva. También quiero agradecer de la forma más sincera al Ilmo. Señor Académico Profesor Doctor Bernabé Sanz Pérez su aceptación como mentor en mi acceso como Académico Correspondiente a la Real Academia Nacional de Farmacia; también agradecer a todos los Académicos, en particular al Ilmo. Señor don Antonio Doadrio Villarejo y a la Ilma. Señora doña Emilia Muñoz Martínez toda la ayuda prestada.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (1983): Presencia histórica del aceite de oliva, en *Las raíces del aceite de oliva. Aceites de oliva vírgenes*. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Política Alimentaria, Madrid, 18-29.
- (2) PALAMAREV, E. (1989): Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics Evolution*. 162: 93-107.
- (3) SUC, J. P. (1984): Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature*. 307: 429-432.
- (4) MATAIX, J. and BARBANCHO, F. J. (2006): Olive oil in Mediterranean Food, en *Olive Oil and Health*. J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, P. Yaqoob (eds.). CAB Internacional, Oxfordshire, UK, 1-44.
- (5) STADISH, R. (1960): *The first of trees. The history of the olive*. Phoenix house, London.
- (6) GONZÁLEZ TURMO, I. y MATAIX VERDÚ, J. (2001): Antecedentes históricos y antropológicos, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. J. Mataix Verdú (ed.). Universidad de Granada, Puleva Food, Granada, vol. 1, 9-18.

- (7) MARTÍNEZ ÁLVAREZ, J. R. y VILLARINO MARÍN, A. (2005): El aceite de oliva en España. Una breve historia, en *El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Nutrición y salud*. Vol. 7. J. A. Pinto Montanillo, J. R. Martínez Álvarez (eds.). Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Salud y Consumo. Alcobendas, Madrid, vol. 7, 7-23.
- (8) DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA de 13-11-2003. Reglamento (CE) n.º 1989/2003, de 6 de noviembre de 2003, que modifica el Reglamento (CEE) n.º 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- (9) BOSKOU, D.; BLEKAS, G. and TSIMIDOU, M. (2006): Olive oil composition, en *Olive oil. Chemistry and technology*. 2nd ed. D. Boskou (ed.). AOCS Monograph Series on Oilseeds. AOCS Press, Champaign, Illinois, 41-72.
- (10) BOSKOU, D.; TSIMIDOU, M. and BLEKAS, G. (2006): Polar phenolic compounds, en *Olive oil. Chemistry and technology*. 2nd ed. D. Boskou (ed.). AOCS Monograph Series on Oilseeds. AOCS Press, Champaign, Illinois, 73-92.
- (11) UCEDA, M. (2000): *Aceites de oliva virgen extra. Calidad y diversidad*. Patrimonio Comunal Olivarero.
- (12) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. (2005): El aceite en la cocina. Normas para un uso adecuado, en *El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Nutrición y salud*. Vol. 7. J. A. Pinto Montanillo, J. R. Martínez Álvarez (eds.). Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Salud y Consumo. Alcobendas, Madrid, 67-76.
- (13) SERRANO MORAGO, L. and LEZCANO MARTÍN, C. (2005): El aceite: valor nutritivo, en *El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Nutrición y salud*. Vol. 7. J. A. Pinto Montanillo, J. R. Martínez Álvarez (eds.). Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Salud y Consumo. Alcobendas, Madrid, 25-49.
- (14) CARBAJAL, A. y SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. (2002): Guía de Prácticas, en *Nutrición y Dietética*. M. T. García Arias, M. C. García Fernández (eds.). Universidad de León. León, 1 a-130 a.
- (15) KEYS, A.; MENOTTI, A.; KARVONEN, M. J.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; DJORDJEVIC, B. S.; DONTAS, A. S.; FIDANZA, F. and KEYS, M. H. (1986): The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* 124: 903-915.
- (16) HARWARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH IN CONJUNCTION WITH OLWAYS PRESERVATION & EXCHANGE TRUST. (1993): *Internacional Conference on the Diet of the Mediterranean*. Cambridge, MA, January 1993.
- (17) MOREIRAS TUNI, O.; CARVAJAL AZCONA, A. y PEREA DEL PINO, I. (1990): *Evolución de los hábitos alimentarios en España*. Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Madrid.
- (18) MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Dirección General de Alimentación. Panel de Consumo Alimentario (1992/95/97/2001/02 y 2003). *La alimentación en España*. Madrid.

- (19) FEDERAL DRUG ADMINISTRATION (FDA) (2004): FDA Allows Health Claim for Olive Oil, http://www.consumeraffairs.com/news04/olive_oil.html último acceso en 18 de mayo de 2007.
- (20) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and BASTIDA, S. (2006): Effect of frying and thermal oxidation on olive oil and food quality, en *Olive Oil and Health*. J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, P. Yaqoob (eds.) CAB International, Oxfordshire, UK, 74-108.
- (21) MATAIX VERDÚ, J. (2001): *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Universidad de Granada, Puleva Food, Granada.
- (22) QUILES, J. L.; RAMÍREZ-TORTOSA, M. C. and YAQOOB, P. (2006): *Olive Oil and Health*. CAB International, Oxfordshire, UK.
- (23) GRUPO DE EXPERTOS SOBRE ACEITE DE OLIVA Y SALUD (2005): Estado de los conocimientos sobre aceite de oliva, la nutrición y la salud. Consejo Oleícola Internacional. Madrid, marzo de 2005.
- (24) BENEDÍ, J. (2006): Discurso de Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid.
- (25) GIL, A. y GIL, M. (2002): Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados y oleico durante la gestación, la lactancia y la infancia, en *Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*. J. Mataix, A. Gil (eds.). Instituto Omega3. Puleva Food, Granada, 82-96.
- (26) DE GROOT, L. C.; VERHEIJDEN, M. W.; DE HENAUW, S.; SCHROLL, M.; VAN STAVEREN, W. A and SENECA INVESTIGATORS (2004): Lifestyle, nutritional status, health, and mortality in elderly people across Europe: a review of the longitudinal results of the SENECA study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59: 1277-1284.
- (27) KNOOPS, K. T. B.; DE GROOT, L. C. P. G. M.; KROMHOUT, D.; PERRIN, A-E.; MOREIRAS-VARELA, O.; MENOTTI, A. and VAN STAVEREN, W. A. (2004): Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women. The HALE Project. *JAMA* 292: 1433-1439.
- (28) GIL HERNÁNDEZ, A.; RAMÍREZ TORTOSA, M. C.; AGUILERA GARCÍA, C. y MATAIX VERDÚ, J. (2001): Aceite de oliva y sistema cardiovascular I. Aterosclerosis, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. J. Mataix Verdú (ed.). Universidad de Granada, Puleva Food, Granada, vol. 2, 79-107.
- (29) MESA, M. D.; AGUILERA, C. M.; RAMÍREZ TORTOSA, C. L.; GIL, A. and RAMÍREZ TORTOSA, M. C. (2006): Effect of olive oil on cardiovascular risk factor, LDL oxidation and atherosclerosis development, en *Olive Oil and Health*. J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, P. Yaqoob (eds.) CAB International, Oxfordshire, UK, 194-239.
- (30) PANAGIOTAKOS, D. B.; PITSAVOS, C.; CHRYSOHOOU, C.; STEFANADIS, C. and TOUTOZAS, P. (2002): The role of traditional Mediterranean-type of diet and lifestyle, in the development of acute coronary syndromes: preliminary results from CARDIO2000 study. *Cent. Eur. J. Public Health*. 10: 11-15.
- (31) PITSAVOS, C.; PANAGIOTAKOS, D. B.; CHRYSOHOOU, C.; SKOUMAS, J.; PAPAIOANNOU, I.; STEFANADIS, C. and TOUTOZAS, P. K. (2002): The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes, in hypercholeste-

- rolemic subjects: a case-control study (CARDIO2000). *Cor. Artery Dis.* 13: 295-300.
- (32) PITSAVOS, C.; PANAGIOTAKOS, D. B.; CHRYSOHOOU, C.; KOKKINOS, P.; SKOUMAS, J.; PAPAIOANNOU, I.; STEFANADIS, C. and TOUTOZAS, P. K. (2002): The effect of the combination of Mediterranean diet and leisure time physical activity on the risk of developing acute coronary syndromes, in hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertension* 16: 517-524.
- (33) PITSAVOS, C.; PANAGIOTAKOS, D. B.; CHRYSOHOOU, C.; PAPAIOANNOU, I.; PAPADIMITRIOU, L.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. and TOUTOZAS, P. (2003): The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome. *Nutr. J.* 2: 1-7.
- (34) TRICHOPOULOU, A.; COSTACOU, T.; BAMIA, C. and TRICHOPOULOS, D. (2003): Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N. Engl. J. Med.* 348: 2599-2608.
- (35) MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; FERNÁNDEZ-JARNE, E.; SERRANO-MARTÍNEZ, M.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. A. and MARTÍN-MORENO, J. M. (2003): Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur. J. Nutr.* 41: 153-160.
- (36) DE LORGERIL, M.; SALEN, P.; MARTIN, J. L.; MONJAUD, I.; DALAYE, J. and MAMELLE, N. (1999): Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction - Final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99, 779-785.
- (37) MATA, P.; ALONSO, R. y MATA, N. (2002): Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular, en *Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*. J. Mataix, A. Gil (eds.). Instituto Omega3. Puleva Food, Granada, 49-63.
- (38) PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; LÓPEZ-SEGURA, F. y MATAIX VERDÚ, J. (2001): Aceite de oliva y sistema cardiovascular II: Trombosis, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. J. Mataix Verdú (ed.). Universidad de Granada, Puleva Food, Granada, vol. 2, 109-140.
- (39) LÓPEZ MIRANDA, J.; LÓPEZ SEGURA, F. y PÉREZ-JIMENEZ, F. (2001): Aceite de oliva, metabolismo de los hidratos de carbono y diabetes mellitus, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. J. Mataix Verdú (ed.). Universidad de Granada, Puleva Food, Granada, vol. 2, 141-153.
- (40) MATTSON, F. H. and GRUNDI, S. M. (1985): Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in men. *J. Lipid Res.* 26: 194-202.
- (41) MENSINK, R. P. and KATAN, M. B. (1992): Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a meta-analysis on 27 trials. *Arterioscler. Thromb.* 12: 911-919.
- (42) KRIS-ETHERTON, P. M. (1999): AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation* 100: 1253-1258.
- (43) MATA, P.; ALONSO, R.; LÓPEZ-FARRE, A.; ORDOVAS, J. M.; LAHOZ, C.; GARCÉS, C.; CAMELO, C.; CODOCEO, R.; BLÁZQUEZ, E. and DE OYA, M. (1996): Effect of

- dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1347-1355.
- (44) MATA, P.; VARELA, O.; ALONSO, R.; LAHOZ, C.; DE OYA, M. and BADIMON, L. (1997): Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2088-2095.
- (45) RÓDENAS, S.; RODRÍGUEZ-GIL, S.; MERINERO, M. C. and SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. (2005): Dietary exchange of an olive oil and sunflower oil blend for extra virgin olive oil decreases the estimate cardiovascular risk and LDL and apolipoprotein AII concentrations in postmenopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* 24: 361-369.
- (46) CUESTA, C.; RÓDENAS, S.; MERINERO, M. C.; RODRÍGUEZ-GIL, S. and SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. (1998): Lipoprotein profiles and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *Eur J Clin Nutr.* 52: 675-683.
- (47) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; MERINERO, M. C.; RODRÍGUEZ-GIL, S.; ORDOVAS, J. M.; RÓDENAS, S. and CUESTA, C. (2002): Dietary fat saturation affects apolipoprotein AII levels and HDL composition in postmenopausal women. *J. Nutr.* 132: 50-54.
- (48) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; OUBIÑA, P.; BENEDÍ, J.; RÓDENAS, S. and CUESTA, C. (1998): A preliminary study on platelet aggregation in postmenopausal women consuming extra-virgin olive oil and high-oleic acid sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 217-223.
- (49) GARCÍA-MURIANA, F. J. (2002): Metabolismo de los ácidos grasos, en *Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud.* J. Mataix, A. Gil (eds.). Instituto Omega3. Puleva Food, Granada, pp. 36-47.
- (50) BOSKOU, D. and VISIOLI, F. (2003): Biophenols in olive oil and olives, en *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and technological aspects.* Eds. M. P. Vaquero; T. García-Arias; A. Carbajal; F. J. Sánchez-Muniz (eds.). Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, 161-169.
- (51) OUBIÑA, P.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; RÓDENAS, S. and CUESTA, C. (2001): Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *Br. J. Nutr.* 85: 41-47. Comentarios en: *Br. J. Nutr.* 2001 85:3-4.
- (52) Burr, M. L.; Fehily, A. M.; Gilbert, J. P.; Rogers, S.; Holliday, R. M.; Sweetnam, P. M.; Elwood, P. C. and Deadman, N. M. (1989): Effect of changes in fat, fish, and fiber intakes on death and reinfarction: Diet and reinfarction Trial (DART). *Lancet* 2: 757-761.
- (53) GISSI-PREVENZIONE INVESTIGATORS (1999): Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E, after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 354: 447-455.
- (54) COVAS, M. I.; NYSSONEN, K.; POULSEN, H. E.; KAIKKONEN, J.; ZUNFT, H. J.; KIESEWETTER, H.; GADDI, A.; DE LA TORRE, R.; MURSU, J.; BAUMLER, H.; NASCETTI,

- S.; SALONEN, J. T.; FITO, M.; VIRTANEN, J.; MARRUGAT, J.; EUROLIVE STUDY GROUP (2006): The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 145: 333-341.
- (55) MARRUGAT, J.; COVAS, M. I.; FITO, M.; SCHRODER, H.; MIRO-CASAS, E.; GIMENO, E.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; DE LA TORRE, R.; FARRE, M.; SOLOS INVESTIGATORS (2004): Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *Eur. J. Nutr.* 43: 140-147.
- (56) PERONA, J. S.; CABELLO-MORUNO, R. and RUIZ-GUTIÉRREZ, V. (2006): The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem.* 17: 429-445.
- (57) GARCÍA MURIANA, F. J. (2002): Efectos anticancerígenos de los ácidos grasos omega-3 y oleico, en *Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*. J. Mataix, A. Gil (eds.). Instituto Omega3. Puleva Food, Granada, pp. 112-125.
- (58) ESCRICH, E.; SOLANAS, M. and MORAL, R. (2006): Olive oil and other dietary lipids, in cancer: Experimental approaches, en *Olive Oil and Health*. J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, P. Yaqoob (eds.) CAB International, Oxfordshire, UK, pp. 317-374.
- (59) QUILES MORALES, J. L.; RODRÍGUEZ HUERAS, J.; WAHLE K. W. J.; BATTINO, M. y MATAIX VERDÚ, J. (2001): Aceite de oliva y cáncer, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. J. Mataix Verdú (ed.). Universidad de Granada, Puleva Food, Granada, vol. 2, 155-183.
- (60) STOLL, B. A. (2002): N-3 fatty acids and lipids peroxidation in breast cancer inhibition. *Br. J. Nutr.* 87: 193-198.
- (61) QUILES, J. L.; FARQUHARSON, A. J.; SIMPSON, D. K.; GRANT, I. and WAHLE, K. W. (2002): Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.* 88: 225-234.
- (62) BOSKOU, D. (1999): Non-nutrient antioxidants and stability of frying oils, en *Frying of food. Oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures*. D. Boskou, I. Elmadfa (eds.). Technomic Publishing CO., INC. Lancaster, Pennsylvania, 183-204.
- (63) OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B. and BARTSCH, H. (2000): Olive-oil consumption and health. The possible role of antioxidants. *Lancet Oncology* 1: 107-112.
- (64) WELSCH, C. W. (1995): Review of the effects of dietary fat on experimental mammary gland tumorigenesis: role of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 757-773.
- (65) HOPKINS, G. J.; KENNEDY, T. G. and CARROLL, K. K. (1981): Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis induced in Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenzanthracene. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 517-522.
- (66) COLLIE-DUGUID, E. S. R. and WAHLE, K. W. J. (1996): «Inhibitory effect of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 969-974.
- (67) MENÉNDEZ, J. A.; DEL MAR BARBACID, M.; MONTERO, S.; SEVILLA, E.; ESCRICH, E.; SOLANAS, M.; CORTES-FUNES, H. and COLOMER, R. (2001): Effects of gamma-

- linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 37: 402-413.
- (68) YAM, D.; PELED, A. and SHINITZKY, M. (2001): Suppression of tumor growth and metastasis by dietary fish oils combined with vitamin E and C and cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47: 37-40.
- (69) Ros, E. (2001): Guía para una alimentación cardiosaludable. Aporte de grasa, en *Guías alimentarias para la población española. Recomendaciones para una dieta saludable*. Sociedad Española de la Nutrición Comunitaria. IM&C, S. A. Madrid, 413-421.

From Pathogenesis to Therapeutic of Type 2 Diabetes. The GK Rat Paradigm

Recibido el 19 de abril de 2007

BERNARD PORTHA *

Lab. Physiopathologie de la Nutrition, CNRS UMR 7059,

Equipe B2PE

Université Paris-Diderot/UP7, 2 Place Jussieu,

75251 Paris Cedex 05, France

ABSTRACT

Now that the reduction in beta-mass has been clearly established in humans with type 2 diabetes mellitus (T2D), the debate focuses on the possible mechanisms responsible for abnormal islet microenvironment, decreased beta-cell number and impaired beta-cell function, and their multifactorial aetiologies. The informations available in the Goto-Kakizaki (GK/Par line) rat, one of the best characterized animal models of spontaneous T2D, are reviewed in such a perspective. We propose that the defective beta-cell mass and function in the GK/Par model reflects the complex interactions of three pathogenic players: i) several independent loci containing genes responsible for some diabetic traits (but not decreased beta-cell mass); (ii) gestational metabolic impairment inducing a programming of endocrine pancreas (decreased beta-cell neogenesis) which is transmitted to the next generation; and (iii) secondary (acquired) loss of beta-cell differentiation due to chronic exposure to hyperglycaemia (glucotoxicity). An important message is that the «heritable» determinants of T2D do not simply rely on genetic factors, but

* Discurso de Toma de Posesión de Académico Correspondiente.

Address correspondence to:

Prof. B. Portha

Lab. Physiopathologie de la Nutrition, CNRS UMR 7059, Université Paris-Diderot,
2 place Jussieu, Tour 33.

75251 Paris Cedex 05, France.

Telephone: +33 144 27 50 11. Fax: +33 144 27 78 91

mail: portha@univ-paris-diderot.fr

probably involve transgenerational epigenetic responses. Finally, studies from our group have shown that pharmacological use of GLP-1 receptor agonist *in vivo* during the GK prediabetes period, induced beta-cell regeneration through activation of beta-cell replication and neogenesis, and doing so prevented the development of hyperglycaemia. This suggests a novel application of GLP-1 receptor agonists to the prevention of human diabetes by treatment of at risk individuals during the prediabetic period. Since we also demonstrated that GLP-1 acutely restores the glucose competence of the GK beta-cell, GLP-1 receptor agonists turn to be very attractive tools for the treatment of the decreased beta-cell functioning mass as encountered in T2D.

Key words: Type 2 diabetes.—GK rat.—Insulin secretion.—GLP-1R agonists.—Beta-cell regeneration.

RESUMEN

De la patogénesis al tratamiento de la diabetes tipo 2. El paradigma de la rata GK

Ahora que la reducción de la masa de la célula beta ha sido claramente establecida en humanos con diabetes mellitas tipo 2 (T2D), el debate se focaliza sobre los posibles mecanismos responsables de un microambiente anormal en el islote, del decrecido número de células beta, del alterado funcionamiento de ellas y de sus etiologías multifactoriales. Las eficaces informaciones proporcionadas por la rata Goto-Kakizaki (línea GK), uno de los mejor caracterizados modelos animales de T2D espontánea, están siendo revisadas para tales fines. Nosotros proponemos que la defectuosa masa y función de la célula beta en el modelo GK reflejan unas interacciones complejas de tres vertientes patogénicas: i) varios loci que contienen genes responsables de algunos indicios diabéticos (pero no de decrecida masa de célula beta); ii) daño metabólico gestacional que induce un programa de páncreas endocrino (decrecida neogénesis de célula beta), lo cual es transmitido a la próxima generación, y iii) secundaria (adquirida) pérdida de diferenciación de célula beta debida a una exposición crónica a hiperglucemia (glucotoxicidad). Un mensaje importante es que los determinantes «heredables» de T2D no descansan simplemente sobre factores genéticos, sino probablemente envuelven respuestas epigenéticas transgeneracionales.

Finalmente, estudios de nuestro grupo han mostrado que el uso farmacológico de agonistas del receptor de GLP-1 *in vivo*, en el periodo de prediabetes de ratas GK, inducían regeneración de célula beta, a través de la activación de la replicación y neogénesis de célula beta y de esta forma prevenían el desarrollo de hiperglucemia. Esto sugiere una nueva aplicación del receptor agonista de GLP-1 para la prevención de diabetes humana por el tratamiento con éste, durante el periodo prediabético, a individuos de riesgo. Como nosotros mostramos, también, que el GLP-1 restaura de forma acusada la sensibilidad a la glucosa de la célula beta GK, los agonistas del receptor de GLP-1 vuelven a ser una herramienta atractiva para

el tratamiento del decrecimiento de la masa funcionante de la célula beta lo cual es encontrada en T2D.

Palabras clave: Diabetes tipo 2.—Rata GK.—Secreción de insulina.—Agonistas GLP-1R.—Regeneración de células beta.

Diabetes mellitus is a heterogeneous group of disorders characterized by high blood glucose levels. The pancreatic beta-cell and its secretory product insulin are central in the pathophysiology of diabetes (1). Type 1 or insulin-dependent diabetes mellitus results from an absolute deficiency of insulin due to autoimmune beta-cell destruction. In type 2, non-insulin-dependent diabetes mellitus (T2D), liver, muscle and fat cells are resistant to insulin actions and the compensatory attempt by the beta-cell to release more insulin is not sufficient to maintain blood glucose levels within a normal physiological range, finally leading to the functional exhaustion of the surviving beta-cells (1). T2D is made up of multiple forms each of which is characterized to variable degrees by insulin resistance and beta-cell dysfunction, and which together lead to hyperglycemia. At each end of this spectrum are single-gene disorders that affect the ability of the beta-cell to secrete insulin or the ability of liver, muscle and fat cells to respond to insulin's actions.

BETA-CELL DYSFUNCTION AS A CAUSE FOR HUMAN TYPE 2 DIABETES

In patients with recognized type 2 diabetes, abnormalities of secretion are present together with insulin resistance and cause glucose intolerance. So far, information related to the functional characteristics of islets from T2D patients is limited. Several groups (2, 3) have recently reported multiple abnormalities of insulin secretion in islets isolated from T2D donors such as: reduced insulin content, poor secretion in response to glucose (whereas leucine, glutamine or arginine challenge remained effective) associated with a marked alteration of mitochondrial function (diminished glucose oxidation, lower ATP/ADP ratio, impaired hyperpolarization of mitochondrial membrane, increased expression of UCP-2) and signs of increased oxidative stress. Structural changes in the islets of T2D

subjects have been also described including the arteriosclerosis, deposition of amyloid associated fibrosis and fat infiltrations (4, 5).

The genetic basis of beta-cell dysfunction in this form of diabetes (the most frequent one) is certainly more complex than in subjects with MODY or mitochondrial diabetes: it involves both multiple interacting genes and environmental factors, which determine whether diabetes will develop and at what age.

The clustering of T2D in families and the high concordance rates noted for identical vs. fraternal twins implies a genetic etiology. However, after years of intensive work by many laboratories, there has been little success identifying T2D susceptibility genes in humans (review in 6).

A role for maternal inheritance in T2D was first suggested by epidemiological studies. Adult patients described as having maturity-onset diabetes had a higher prevalence of T2D in the maternal side over two generations compared to the paternal side suggesting a higher maternal transmission (7). In addition, in patients with gestational diabetes, higher frequency of diabetes in mothers than in fathers was reported (8). The maternal influence in the development of T2D has been reported in the majority of studies (9). Although a few studies did not find a maternal effect, none reported a higher paternal transmission. Foetal exposure to T2D as an environmental factor that may explain the maternal transmission of T2D, was first demonstrated in Pima Indians, a population with the highest prevalence of T2D reported around the world (10). In order to negate the confounding effect of genetic factors related to T2D, the effect of in utero exposure to type 1 diabetes was recently studied in a group of adult offspring free from immunological markers of type 1 diabetes: a 33% prevalence of IGT was reported in offspring of mothers compared to none of the offspring of fathers (control group) (11). Taken together, these findings strongly suggest that in utero exposure to diabetes is associated with abnormal glucose homeostasis in offspring of diabetic mothers and may participate in the excess of maternal transmission in T2D.

To sum-up, now that the reduction in beta-mass has been repeatedly established in humans with T2D, the debate focuses on

the possible mechanisms responsible for decreased beta-cell number and impaired beta-cell function and their multifactorial aetiology.

Hazard of invasive sampling and lack of suitable non-invasive methods to evaluate beta-cell mass and beta-cell functions are strong limitations for studies of the living pancreas in human. In such a perspective, appropriate rodent models are essential tools for identification of the mechanisms that increase the risk of abnormal beta-cell mass/function and of T2D. Some answers to these major questions are available from studies using the Goto-Kakizaki (GK) rat model of T2D and they are reviewed in the present paper. The GK rat is a non obese substrain of Wistar rat origin, developing T2D early in life. Mild fasting hyperglycaemia and postprandial glucose intolerance are primarily due to impaired beta-cell mass and function on the background of a polygenic inheritance. In addition, secondary defects in beta-cell function and insulin action may superimpose (e.g., due to chronic hyperglycaemia [glucotoxicity]). Since the GK rat can be regarded as one of the best available rodent strains for the study of inherited T2D, it is extensively used in preclinical diabetes research.

THE GOTO-KAKIZAKI WISTAR (GK) RAT MODEL OF SPONTANEOUS TYPE 2 DIABETES

Most rodent models used for studies of the inheritance of T2D (ob/ob mouse, db/db mouse, ZDF rat, OLETF rat) show association of hyperglycaemia and obesity with insulin resistance. However, in the inbred GK (Goto-Kakizaki) rat line and more specifically in our colony (GK/Par subline) maintained since 1989, all rats are nonobese, nonketotic, and display mild fasting hyperglycaemia. The GK line was established by repeated inbreeding from Wistar (W) rats selected at the upper limit of normal distribution for glucose tolerance (12-14) (Figure 1).

The adult GK/Par body weight is 10-30% lower than that of age and sex-matched control animals. In male GK/Par rats, non-fasting plasma glucose levels are typically 10-14 mM (6-8 mM in age-matched Wistar outbred controls). In female GK rats, somewhat lower plasma glucose concentrations are noted. Non-fasting plasma insulin levels in GK rats

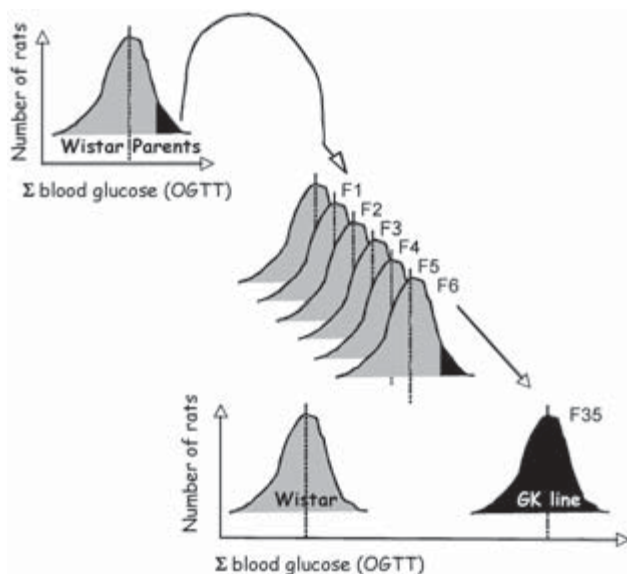


FIGURE 1. **Design for the production of spontaneously diabetic GK rat by repetition of selective phenotyping:** here is shown the distribution of the sum of blood glucose values (Σ blood glucose) during a standardised oral glucose tolerance test (OGTT) in original parent Wistar rats and F1 to F35 rats. The GK rat line (Wistar strain) has been produced by Goto *et al.* in Tohoku University, Sendai, Japan, by selective breeding over many generations from a non diabetic Wistar rat colony on the basis of glucose intolerance (12). The diabetic state was reported to become stable after the 30 generations of selective crosses.

from all colonies have been found similar or somewhat increased as compared to age-matched controls. During the long-term inbreeding of GK rats (> 20 years) the animals have maintained rather stable levels of glucose intolerance and impairment of glucose-induced insulin response, also when studied in the various sublines of GK rats. However, other characteristics such as beta cell number, insulin content and islet metabolism have been reported to differ between different subline colonies, suggesting that different local breeding environment and/or newly introduced genetic changes account for contrasting phenotypic properties, but it is not clear whether the reported differences are artefactual or true. Signs of early neuropathy (2 mo) have been reported in GK adult while nephropathy and retinopathy develop late (12 mo). The VMH-lesioned GK rat displays accentuated hyperglycaemia and hypertriglyceridaemia with visceral

fat accumulation and both microangiopathy and macroangiopathy. Figure 2 summarizes the GK/Par rat pathogenic sequence culminating in the chronic hyperglycaemia at adult age.

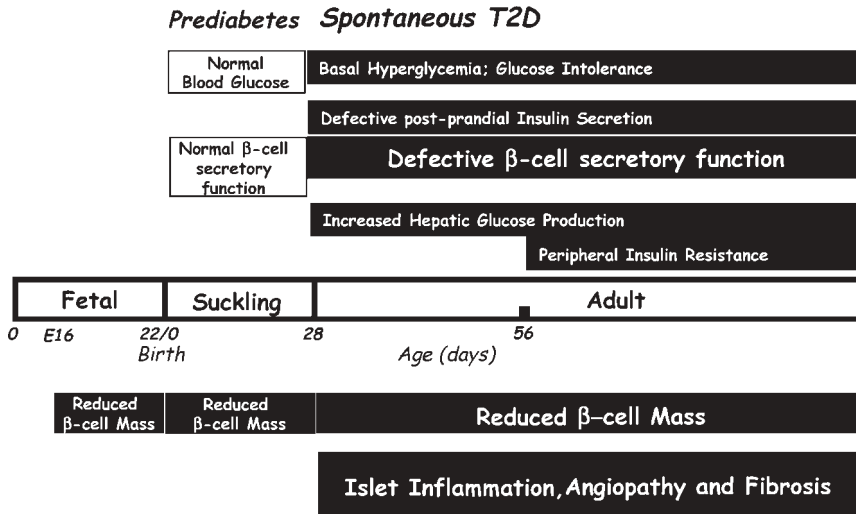


FIGURE 2. *Time-course of diabetes in the GK/Par rat model.* Males and females are similarly affected and their diabetic state is stable over 72 weeks of follow up (13). In adult GK rats, plasma insulin release in vivo in response to i.v. glucose is abolished (13). In vitro studies of insulin release with the isolated perfused pancreas or with perfused islets indicate that both the early and late phases of glucose-induced insulin release are markedly affected in the adult GK rat. Concerning insulin action in adult GK rats, decreased insulin sensitivity has been reported in the liver, in parallel to moderate insulin resistance in extrahepatic tissues (muscles and adipose tissues) (13). Hyperglycaemia is preceded by a period of normoglycaemia, ranging from birth to weaning (15). Therefore during this period the young GK rats can be considered to be prediabetic.

WHAT IS WRONG IN THE BETA-CELL POPULATION OF THE GK/PAR RAT ONCE DIABETES IS THERE?

Decreased beta-cell number

In the adult GK/Par, total pancreatic beta-cell mass and pancreatic insulin stores are similarly decreased (by 60%) (15). This alteration of

the beta-cell population cannot be ascribed to increased beta-cell apoptosis but is related, at least partly, to significantly decreased beta-cell replication (13). Moreover, the adult GK/Par pancreas exhibits two different populations of islets: large islets which are disrupted by connective tissue (15) and display heterogeneity in the staining of the beta-cells, and small islets with heavily stained beta-cells and normal architecture.

The islets of adult GK/Par rats show decreased beta-cell number and low insulin content compared with control islets. The islet DNA content was decreased to a similar extent, consistent with our morphometric data, which indicates that there is no major change in the relative contribution of beta-cells to total endocrine cells in the GK islets. In addition, the insulin content, when expressed relative to DNA, remains lower in GK islets than in control (inbred Wistar/Par) islets, which supports some degranulation in the beta-cells of diabetic animals (16).

Moreover, using a complementary approach that associated gene expression analysis (Affymetrix microarrays), quantitative RT-PCR and immunohistochemical studies of pancreata as a function of hyperglycaemia duration, we have recently demonstrated that an inflammatory reaction is associated with islet fibrosis in 4-month-old diabetic GK rats according to a process reminiscent of microangiopathy (17). These alterations worsened with hyperglycaemia duration and might contribute to enhanced GK beta-cell impairment.

Decreased beta-cell population due to early limitation of beta-cell neogenesis

Extensive follow-up of the animals after delivery revealed that GK/Par pups become overtly hyperglycaemic for the first time after three to four weeks of age only. Nevertheless, total beta-cell mass in GK neonates is clearly decreased (by 60%) when compared with Wistar rats (Figure 2) (15). We first previously demonstrated that the early beta-cell growth retardation in the GK/Par model cannot be ascribed to decreased beta-cell replication, nor to increased apoptosis (15). We therefore postulated that the recruitment of new beta-cells

from the precursor pool was defective in the young GK rat. A meaningful set of data from our group (18-20) suggests that the permanently reduced beta-cell mass in the GK rat indeed reflects a limitation of beta-cell neogenesis during early fetal life.

First, the comparative study of the development of GK and Wistar pancreases indicates that the beta-cell deficit (reduced by more than 50%) starts as early as fetal age 16 days (E16) (19). The decreased proliferation and increased apoptosis in the ductal compartment of the pancreas where the putative endocrine precursor cells localize suggests that the impaired development of the beta-cell in the GK fetus could result from the failure of the proliferative and survival capacities of the endocrine precursor cells. Importantly, recent data from our group indicate that defective signalling through the *Igf2*/*Igf1-R* pathway represents a primary anomaly since *Igf2* and *Igf1-R* protein expressions are already decreased within the GK pancreatic rudiment at E13.5, at a time when beta-cell mass (first wave of beta cell expansion) is in fact normal (21). Low levels of pancreatic *Igf2* associated with beta-cell mass deficiency is maintained thereafter within the fetal pancreas (22) (Figure 3). We also have unpublished data related to crossbreeding protocols between non-diabetic W and diabetic GK rats: at E18.5, *Igf2* protein expression is low in GK/GK, W/GK and GK/W pancreata, similar low values in E18.5 crossed W/GK and GK/W fetuses, those values being close to that observed in GK/GK fetuses of the same age. These findings rather support the hypothesis that the pancreatic *Igf2* anomaly in the GK diabetic model is linked to a genetic determinism. This view is also consistent with the results of genetic analyses that linked a locus containing the gene encoding *Igf2* to diabetes in the GK rat (23). The *Igf2* gene is subjected to paternal genomic imprinting (24). However, because the *Igf2* expression is similarly affected in fetuses, regardless of whether the father is W or GK, we cannot conclude to a simple change of *Igf2* gene imprinting in the GK rat.

Second, to evaluate the capacity for beta-cell compensatory growth during the neonatal period, we took advantage of the report that the destruction of the beta-cell mass subsequent to streptozotocin injection in the neonatal rat is followed by spontaneous regeneration through both differentiation of precursor cells (neogenesis) and increased proliferation of surviving beta-cells (18). Using such

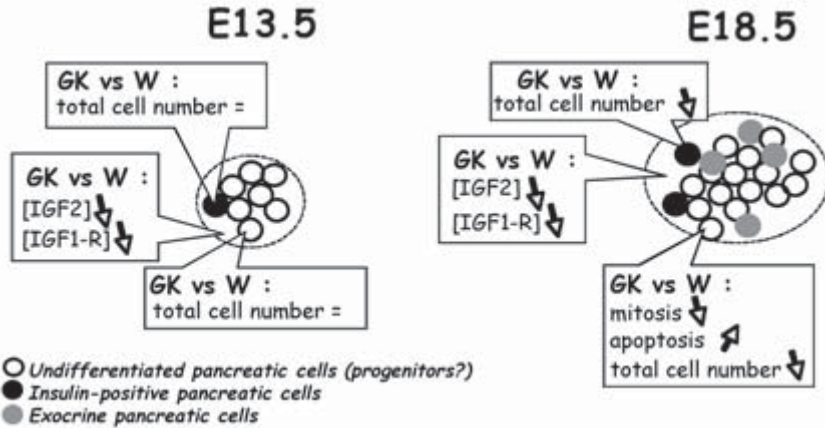


FIGURE 3. *Schematic presentation of the defective early pancreatic development in the GK/Par rat. Pancreatic cell proliferation and apoptosis were estimated at embryonic ages E13.5 and E18.5. Comparison of the dorsal pancreatic buds in GK and Wistar (W) rats indicates that the differentiation of the early endocrine cells which appear between E12-E14 is preserved in GK, the number of insulin- or glucagon-expressing cells being similar to Wistar pancreases. Analysis of cell proliferation and apoptosis revealed no differences between Wistar and GK pancreases at this stage. By contrast at E18.5 onward, the number of beta-cells differentiating from the ductal network is reduced by 74% in the GK rat. The apoptotic cells in the E18.5 GK pancreas are not endocrine cells since we did not detect TUNEL-positive cells expressing insulin or glucagon. Moreover these undifferentiated pancreatic cells exhibit a decreased replicative activity. The morphological analysis of the sections suggested that the apoptotic cells in the GK pancreas are ductal cells. IGF-2 protein expression was decreased by 27% and 58% on E13.5 and E18.5 respectively, in GK pancreatic rudiments as compared to W controls. IGF-1R protein expression was decreased by 42% and 34% on E13.5 and E18.5 respectively in GK pancreatic rudiment as compared to W controls. Therefore, the defective IGF2 and IGF1-R protein expression within the GK pancreatic rudiment (E 13.5) precedes the beta-cell mass anomaly. ↑ represents an increase, ↓ represents a decrease, and = means no change.*

approach, we have shown that the regeneration of the beta-cell mass was impaired in streptozotocin-treated newborn GK rats. Because the index of beta-cell proliferation in the streptozotocin-treated GK and Wistar neonates was identical, it was concluded that the impaired beta-cell regeneration of the GK pancreas results from defective neogenesis (18).

Third, similar conclusions were drawn from duct-cell remodelling and beta-cell regeneration investigations after partial pancreatectomy in the adult GK rat (20).

Taken together, these data are consistent with the notion that a poor proliferation and/or survival of the endocrine precursors during foetal, neonatal and adult life will result in poor development of the beta-cell mass, as well as a decreased pool of endocrine precursors in the pancreas, and hence to an impaired capacity of regeneration by neogenesis (either primary in the fetus or compensatory in the newborn and the adult). Finally, the earliest alteration detected in the GK/Par rat targets the size of the beta-cell population. It is conceivable that some genes among those involved in the GK/Par diabetes belong to the subset of genes controlling early beta-cell development.

Functionally defective beta-cells

In adult GK/Par rats, the plasma insulin release *in vivo* in response to intravenous glucose was lacking (12-14). *In vitro* studies of insulin release with the isolated perfused pancreas or with perfused islets indicated that both the early and late phases of glucose-induced insulin release were markedly affected in the adult GK/Par rat. We have shown that impaired glucose-induced insulin release in GK/Par islets was associated with perturbation of multiple intracellular sites. Since this aspect has been recently and extensively reviewed by us and others (13, 14), it will not be further considered in this paper. Figure 4 illustrates a compendium of the abnormal intracellular sites so far identified in the diabetic GK beta-cell.

WHAT ARE THE MECHANISMS THAT UNDERLIE THE PROGRAMMING OF THE GK BETA-CELL DYSFUNCTIONS?

Is beta-cell functional failure due to the abnormal metabolic environment (gluco-lipototoxicity)?

In the GK/Par rat, basal hyperglycaemia and normal to very mild hypertriglyceridaemia are observed only after weaning (13, 15). The onset of a profound alteration in glucose-stimulated insulin secretion by the GK beta-cell (after weaning) is time-correlated with the

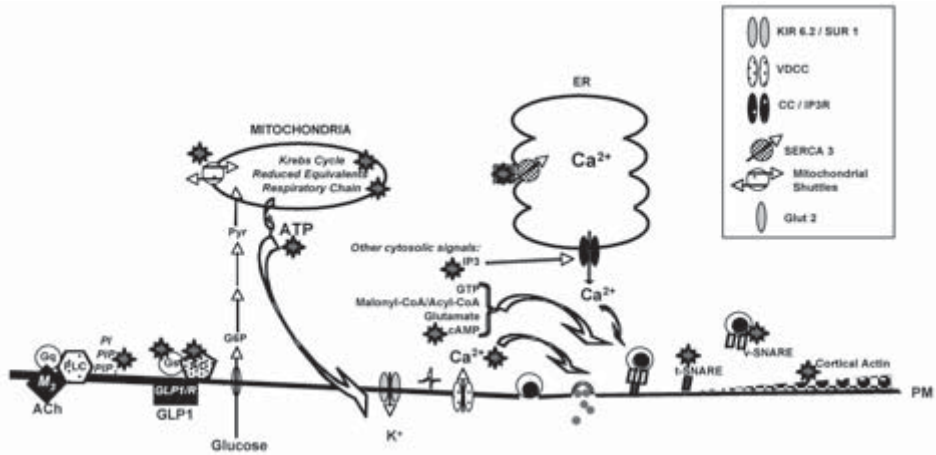


FIGURE 4. Model for defective glucose-induced insulin release and the abnormal intracellular sites identified in the diabetic GK beta-cell (13). Impaired insulin response to glucose may be attributed to impaired elevation of intracellular $[Ca^{2+}]_i$, which is a consequence of the failure by glucose to augment L-type Ca^{2+} channel activity, owing to insufficient plasma membrane depolarization reflecting impaired closure of the ATP-sensitive K^+ channels; this is the result of insufficient cytosolic ATP generation by glucose. Abnormal Ca^{2+} handling by the endoplasmic reticulum in response to high glucose may also contribute to the defective Ca^{2+} signalling. The sequestration of calcium by endoplasmic reticulum during high glucose exposure (attributed to activation of the calcium-ATPases, SERCAs) may be impaired in the GK beta-cell. Impaired calcium sequestration could also occur because of insufficient cytosolic ATP generation in response to high glucose. In GK islets, glucose fails to increase inositol-phosphate (IP3) accumulation. This is linked to an anomaly in targeting the phosphorylation of phosphoinositides: the activity of phosphatidylinositol kinase, the first of the two phosphorylating activities responsible for generating phosphatidylinositol biphosphate, is reduced. Moreover, deficient calcium handling and ATP supply in response to glucose probably contributes to abnormal activation of PI kinases and phospholipase C. Concerning cAMP, it is remarkable that its intracellular content is high in GK β -cells already at low glucose. This is related to increased expression of the cyclase isoforms 1, 2, 3 and of the $G_s\alpha$ and $G_{\alpha olf}$ proteins. Furthermore, cAMP is not further enhanced at increasing glucose concentrations (at variance with the situation in normal beta-cells). Moreover, reduced levels of several exocytotic SNARE proteins including VAMP-2, syntaxin 1A and SNAP-25, have been demonstrated in GK islets. We also recently found that the assembly/disassembly of the cortical actin cytoskeleton beneath the plasma membrane, is functionally abnormal in GK islets. Where data are available, the impaired sites in the GK beta-cell are indicated with a symbol: \star
 Abbreviations: AC, adenylates cyclases; Gs, Gq: heterotrimeric G proteins; PI kinase, phosphatidylinositol-kinase; SERCA3, type3 calcium-ATPase; SNAP, soluble NSF attachment protein; tSNARE, v-SNARE: SNARE proteins (syntaxin, SNAP-25); VDCC, L-type calcium channel.

exposure to the diabetic milieu. These changes in islet function can be ascribed, at least in part, to a loss of differentiation of beta-cells chronically exposed to even mild chronic hyperglycaemia and elevated plasma non-esterified fatty acids, a process referred to as «gluco-lipotoxicity». When studied under in vitro static incubation conditions, islets isolated from normoglycaemic (prediabetic) GK/Par pups, amplified their secretory response to high glucose, leucine or leucine plus glutamine to the same extent as Wistar islets (13). Therefore, there does not exist a major intrinsic secretory defect in the prediabetic GK/Par beta-cell, which can be considered as normally glucose-competent at this stage. Such a view is supported by the recent reports that chronic treatment of GK rats with phlorizin partially improved glucose-induced insulin release (25, 26, Bailbé and Portha, unpublished data), while hyperlipidaemia induced by high-fat feeding markedly impaired insulin secretion (27).

Consequently, the lack of beta-cell reactivity to glucose, as seen during the adult period when the GK/Par rats are hyperglycaemic in the basal state, represents an acquired defect mainly related to glucotoxicity.

Which determinants (morbid genes vs environment) for early deficiency of the beta-cell mass in the GK/Par model?

Concerning the potential maternal influence on the development of T2D in the GK model, Gauguier et al. (28) reported that adult offspring of GK females crossed with Wistar males have a more marked hyperglycaemia than adult offspring of Wistar females crossed with GK males, suggesting higher maternal inheritance. However, this conclusion was not confirmed in other studies and cross-breeding experiments do not overcome the difficulty to isolate the respective contribution of genetic vs. intrauterine environmental factors. Recently, Gill-Randall et al. (29) developed an embryo transfer system to examine more convincingly that major point. First, these authors showed that offspring from GK embryos transferred in the uterus of euglycaemic W mother still develop T2D when adults, therefore highlighting a role for genetic factors. Second, they showed that offspring from W embryos reared in hyperglycaemic GK mothers were significantly hyperglycaemic at adulthood (29).

Thus, in W rats with no genetic risk of diabetes, exposure to hyperglycaemia *in utero* (as seen in the GK pregnant mother) increases the risk of hyperglycaemia in adult life (29), this clearly illustrating a diabetogenic role for the GK intrauterine environment.

Concerning the impact of maternal hyperglycaemia (as induced experimentally in the rat by streptozotocin (30) or glucose infusion (31) on beta-cell function specifically, it has been long recognized that it persists into adult life and the second and third generation offsprings. Another recent illustration is offered by observations in rat pups reared artificially on a high carbohydrate (HC) milk formula (32): such alteration of nutrition during the suckling period only, induces persistent adaptation of energy metabolism in adulthood (obesity, glucose intolerance, impaired insulin secretion) and the HC fed females spontaneously transmitted their metabolic characteristics to their progeny without the pups themselves having to undergo any nutritional treatment (32). Taken as a whole, information from the HC rat pup model (32) and from the offspring of mildly hyperglycaemic rat mothers (33) suggests that hyperglycaemia experienced during the foetal and/or early postnatal life contributes to programming of the endocrine pancreas. Such a scenario also potentially applies to the GK/Par model, as GK/Par mothers are slightly hyperglycaemic through their gestation and during the suckling period. Therefore, the gestational diabetic pattern of the GK/Par mothers may contribute per se (besides inherited disease genes) to establish and/or maintain the transmission of endocrine pancreas programming from one GK/Par generation to the next one. By such mechanism, the GK/Par rat can be viewed as a model of developmental programming for T2D (associated to programming for low beta-cell mass), with a stable transgenerational transmission.

Two functional point mutations in the promoter region of the adenylyl cyclase type 3 (AC3) gene have been reported in both islets and peripheral blood of GK rats in the Stockholm colony and are associated to GK beta-cell AC3 over expression and increased cAMP generation (34). The contribution if any, of such a mutation to the GK beta-cell growth defect is so far unknown.

Gauguier et al. (23) using a quantitative trait locus (QTL) approach, have identified six independently segregating loci

containing genes regulating fasting plasma glucose and insulin levels, glucose tolerance, insulin secretion and adiposity in GK/Par rats. The same conclusion was drawn by Galli et al. (35) using GK from the Stockholm colony. This established the polygenic inheritance of diabetes-related parameters in the GK rat. Both studies found the strongest evidence of linkage between glucose tolerance and markers spanning a region on rat chromosome 1, called Niddm1 locus. While it must be recognized that many of the glucose-controlling locus variants reported (23, 35, 36) were associated in fact with hyperinsulinaemia or enhanced insulin secretion, more recent works using congenic technology have identified on the Niddm1i locus a 3.5 cM region containing approximately ten genes, as a major susceptibility locus for defective insulin secretion (37). However, no QTL association with beta-cell mass or beta-cell size is found in the GK/Par rat (Ktorza and Gauguier, unpublished data). Therefore, the likelihood that a genotype alteration contributes to the low beta-cell mass phenotype in the GK/Par rat, is reduced. The raised question to be answered now is the following: does epigenetic perturbation of gene expression occur in the developing GK pancreas and does it contribute to the alteration of early beta-cell growth? *igf2* and *igf1r* genes are good candidates for such a perspective.

WHICH THERAPEUTIC FOR A DECREASED BETA-CELL FUNCTIONAL MASS AS SEEN IN THE GK RAT? A ROLE FOR GLP-1 RECEPTOR AGONISTS

Current therapy of T2D includes a modification of life style such as diet and exercise and the use of a variety of pharmacological agents that target increased insulin secretion, decreased hepatic glucose production and increased insulin action. Despite these approaches, a number of T2D patients may require exogenous insulin. Facilitation of T2D treatment may be obtained through beta-cell transplantation, or on more prospective basis, beta-cell mass expansion after stimulation of beta-cell regeneration/neogenesis in the diabetic patients. Indeed, the emerging understanding of beta-cell growth in the adult, from precursor cells found in the pancreatic ducts, hold the promise of developing new strategies for stimulating beta-cell regeneration. Such approach may involve the delivery of

appropriate growth factors to these progenitor cells to obtain a full beta-cell phenotype. GLP-1 could be one of the most promising candidate for doing so.

GLP-1 is an incretin and is produced by the L-cells of the intestine (review in 38). Since its discovery, GLP-1 has received much attention as a possible new treatment for type 2 diabetes. GLP-1 stimulates insulin secretion and biosynthesis and inhibits glucagon release and both these effects are glucose dependent and therefore represent a very safe way of lowering increased blood glucose (38). A key factor limiting the therapeutic potential of GLP-1 is, however, its very short half-life *in vivo* (38). Therefore, GLP-1 analogs with longer duration of *in vivo* actions have been studied. Exendin-4 (Ex-4; now marketed as an antidiabetic under the name exenatide), a peptide isolated from the salivary secretions of *Heloderma suspectum* is one of them (38). Ex-4 shows 53% amino acid identity to GLP-1 and similar insulinotropic action compared to GLP-1 (38). Lately, it was demonstrated that both GLP-1 and Ex-4 were able to stimulate growth and proliferation of pancreatic beta-cells *in vitro* and *in vivo* in adult rodents (38).

Taking advantage of the opportunity that the GK model is a unique one to test the effect of any pharmacological agent suspected to target the beta cell growth and function under conditions of spontaneous T2D, we evaluated if a GLP-1 or Ex-4 treatment applied during few days in pre-diabetic stage in GK rats would halt or prevent the pathological progression.

Accordingly, we have raised the question of what is the impact of GLP-1 or Ex-4 treatment, first in term of beta-cell mass enlargement and long-term improvement of glucose homeostasis in the GK model. To address this issue, we have investigated the capacity of GLP-1 or Ex-4 treatment to promote beta-cell proliferation in GK rats during the pre-diabetic stage and thereby to prevent the pathological progression of the T2D when animals become adults. To this end, GK rats were submitted to GLP-1 or Ex-4 injection from postnatal day 2 to day 6 only, and their body weight and plasma glucose and insulin levels were examined longitudinally from weaning to adulthood (39). Their beta-cell mass and pancreatic functions were tested on day 7 and later on, at 2 months. Both treatments enhanced,

on day 7, pancreatic insulin contents and total beta-cell mass by stimulating beta-cell neogenesis and beta-cell regeneration. Follow up of biological characteristics from day 7 to adult age (2 months) showed that both treatment exerted long-term favorable influence on beta-cell mass and glycaemic control at adult age (Figure 5). As compared to untreated GK rats, 2-month-old GLP-1 or Ex-4 treated GK rats exhibited significantly decreased basal plasma glucose. Their glucose-stimulated insulin secretion, *in vivo* after intravenous glucose load or *in vitro* using isolated perfused pancreas, were improved. Moreover, plasma glucose disappearance rate was increased in both treated GK groups compared to untreated GK group (39). These findings in the GK model indicate that a GLP-1 or Ex-4 treatment limited to the pre-diabetic period, delays the installation and limits the severity of T2D.

We have also raised the question of what is the acute impact of GLP-1 in term of beta-cell secretory function in the GK model. To that aim, we have determined the effect of an acute GLP-1 exposure on GK islets. We first found that GLP-1 was able to restore the glucose competence of the GK beta-cell with a clear return of the biphasic pattern of insulin release (Figure 6). Then, we have demonstrated that this is by a mechanism which mainly reflects an enhanced efficacy of Ca^{2+} on exocytosis (in the absence of Ca^{2+} elevation) and directly relates to an enhanced production of cAMP and overexpression of AC1, 2, and 3 isoforms and $Gs\alpha$ in the GK beta-cells. Such a sensitization to GLP-1 allows acute normalization of the defective glucose responsiveness of the GK beta-cell (40).

According to our preclinical studies in the GK model, the GLP-1 receptor agonists therefore represent a class of compound with unique property due to their beta-cell replenishing effect in spontaneously diabetic rodents. They may prove invaluable agent not only for treatment of yet installed human T2D but also for its prevention.

In conclusion, the defective beta-cell mass and function in the GK/Par model reflects the complex interactions of three pathogenic players: i) several independent loci containing genes responsible for some diabetic traits (but not decreased beta-cell mass); (ii) gestational metabolic impairment inducing a programming of

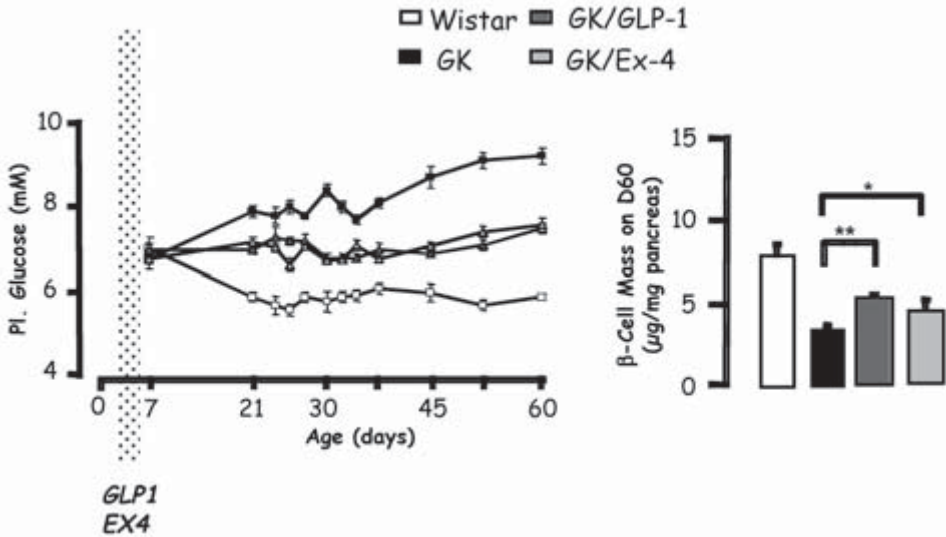


FIGURE 5. *GLP-1 or Exendin-4 treatment promotes beta-cell proliferation in GK rats during the pre-diabetic stage and thereby prevents the pathological progression of the T2D when animals become adults. Left panel: Evolution of post-absorptive basal plasma glucose levels of W, GK, GK/GLP-1 and GK/Ex-4 from 7 days to 2 months of age. Values are expressed as mean ± SEM. In each group, 10 to 15 animals were studied. Right panel: Total pancreatic beta-cell mass quantification in 60-day-old W, GK, GK/GLP-1 and GK/Ex-4 rats. Values are expressed as mean ± SEM for 4 observations in each group. ** p<0.01; * p<0.05 compared with untreated GK rat.*

endocrine pancreas (decreased beta-cell neogenesis) which is transmitted to the next generation; and (iii) secondary (acquired) loss of beta-cell differentiation due to chronic exposure to hyperglycaemia (glucotoxicity). An important message is that the «heritable» determinants of T2D are not simply dependant of genetic factors, but probably involve transgenerational epigenetic responses.

ACKNOWLEDGMENTS

This review is a modified version of the conference I presented on April 19, 2007, with the occasion of becoming Académico Correspondiente extranjero of the Real Academia Nacional de Farmacia. I thank Dr. Ana-María Pascual-Leone for spanish version

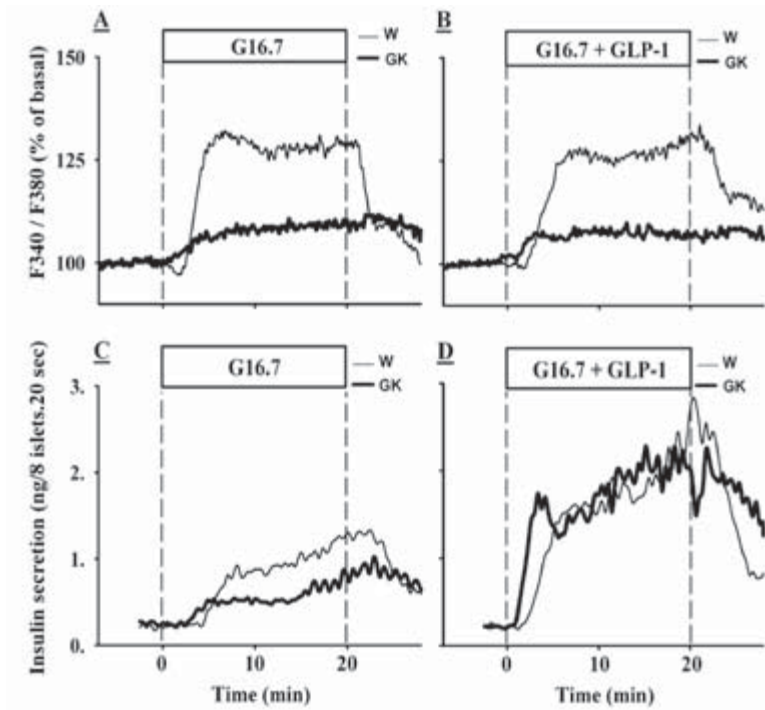


FIGURE 6. **GLP-1 restores blunted glucose-stimulated insulin secretion by GK islets.** Wistar or GK islets were perfused with a medium containing 2.8 mM Glucose (G). G16.7 and GLP-1 were added as indicated. A and B: $[Ca^{2+}]_i$ values. C and D: insulin secretion. Data are means of 4 to 8 experiments from three to six different islet preparations in each group.

of the abstract and past and present members of the laboratory for their continuing efforts.

REFERENCES

- (1) DONATH, M. Y. and HALBAN P. A. (2004): Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*. 47: 581-589.
- (2) DEL GUERRA, S.; LUPI, R.; MARSELLI, L.; MASINI, M.; BUGLIANI, M.; SBRANA, S.; TORRI, S.; POLLERA, M.; BOGGI, U.; MOSCA, F.; DEL PRATO, S. and MARCHETTI, P. (2005): Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 54: 727-735.

- (3) ANELLO, M.; LUPI, R.; SPANPINATO, D.; PIRO, S.; MASINI, M.; BOGGI, U.; DEL PRATO, S.; RABUZZO, A. M.; PURRELLO, F. and MARCHETTI P. (2005): Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 48: 282-289.
- (4) BUTLER, A. E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R. A. and BUTLER P. (2003): Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type2 diabetes. *Diabetes*. 52: 102-110.
- (5) ZHAO, H. L.; LAI, F.; TONG, P.; ZHONG, D. R.; YANG, D.; TOMLINSON, B. and CHAN, J. (2003): Prevalence and clinicopathological characteristics of islet amyloid in chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52: 2759-2766.
- (6) MCCARTHY, M. I. and FROGUEL, P. (2002): Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E217-E225.
- (7) DORNER, G.; MOHNIKE, A. and STEINDEL, E. (1975): On possible genetic and epigenetic modes of diabetes transmission. *Endokrinologie*. 66: 225-227.
- (8) MARTIN, A. O.; SIMPSON, J. L.; OBER, C. and FREINKEL, N. (1985): Frequency of diabetes mellitus in mothers of probands with gestational diabetes: possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151: 471-475.
- (9) ALCOLADO, J. C.; LAJI, K. and GILL-Randall, R. (2002): Maternal transmission of diabetes. *Diabet. Med.* 19: 89-98.
- (10) PETTITT, D. J.; ALECK, K. A.; BAIRD, H. R.; CARRAHER, M. J.; BENNETT, P. H. and KNOWLER, W. C. (1988): Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes*. 37: 622-628.
- (11) SOBNGWI, E.; BOUDOU P.; MAUVAIS-JARVIS F.; LEBLANC, H.; VELHO, G.; VEXIAU, P.; PORCHER, R.; HADJADJ, S.; PRATLEY, R.; TATARANNI, P. A.; CALVO, F. and GAUTIER, J. F. (2003): Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet*. 361: 1861-1865.
- (12) GOTO, Y.; KAKIZAKI, M. and MASAKI, N. (1975): Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jpn. Acad.* 51: 80-85.
- (13) PORTHA, B.; GIROIX, M. H.; SERRADAS, P.; GANGNERAU, M. N.; MOVASSAT, J.; RAJAS, F.; BAILBÉ, D.; PLACHOT, C.; MITHIEUX, G. and MARIE, J. C. (2001): β -cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par colony. *Diabetes*. 50: 89-93.
- (14) ÖSTENSON, C. G. (2001): The Goto-Kakizaki rat. In: *Animal Models of Diabetes: A Primer* (Sima, AAF. and Shafrir, E. eds), Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 197-211.
- (15) MOVASSAT, J.; SAULNIER, C.; SERRADAS, P. and PORTHA, B. (1997): Impaired development of pancreatic b-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia*. 40: 916-925.
- (16) GIROIX, M. H.; SAULNIER, C. and PORTHA, B. (1999): Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia*. 42: 965-977.
- (17) HOMO-DELARCHE, F.; CALDERARI, S.; IRMINGER, J. C.; GANGNERAU, M. N.; COULAUD, J.; RICKENBACH, K.; DOLZ, M.; HALBAN, P.; PORTHA, B. and SERRADAS, P. (2006):

- Islet Inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK Rat. *Diabetes*. 55: 1625-1633.
- (18) MOVASSAT, J. and PORTHA, B. (1999): Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia*. 42: 1098-1106.
 - (19) MIRALLES, F. and PORTHA, B. (2001): Early development of β -cells is impaired in the GK rat model of type2 diabetes. *Diabetes*. 50 (Suppl.1): 84-88.
 - (20) PLACHOT, C.; MOVASSAT, J. and PORTHA, B. (2001): Impaired β -cell regeneration after spatial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem. Cell. Biol.* 116: 131-139.
 - (21) CALDERARI, S.; GANGNERAU, M. N.; THIBAUT, M.; MEILE, M. J.; ÁLVAREZ, C.; KASSIS, N.; PORTHA, B. and SERRADAS, P. (2007): Defective IGF-2 and IGF-1R protein expressions in embryonic pancreas precede beta-cell mass anomaly in GK rat. *Diabetologia*. 50: 1463-1471.
 - (22) SERRADAS, P.; GOYA, L.; LACORNE, M.; GANGNERAU, M. N.; RAMOS, S.; ÁLVAREZ, C.; PASCUAL-LEONE, A. M. and PORTHA, B. (2002): Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 51: 392-397.
 - (23) GAUGUIER, D.; FROGUEL, P.; PARENT, V.; BERNARD, C.; BIHOREAU, M. T.; PORTHA, B.; JAMES, M. R.; PENICAUD, L.; LATHROP, M. and KTORZA, A. (1996): Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat. Genet.* 12: 38-43.
 - (24) LEE, J. E.; PINTAR, J. and EFSTRATIADIS, A. (1990): Pattern of the insulin-like growth factor 2 gene expression during early mouse embryogenesis. *Development*. 119: 151-159.
 - (25) LING, Z. C.; HONG-LIE, C.; OSTENSON, C. G.; EFENDIC, S. and KHAN, A. (2001): Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes*. 50 (Suppl.1): 108-112.
 - (26) GAISANO, H. Y.; OSTENSON, C. G.; SHEU, L.; WHEELER, M. B. and EFENDIC, S. (2002): Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in Goto-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology*. 143: 4218-4226.
 - (27) BRIAUD, I.; KELPE, C. L.; JOHNSON, L. M.; TRAN, P. O. and POITOUT, V. (2002): Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes*. 51: 662-668.
 - (28) GAUGUIER, D.; NELSON, I.; BERNARD, C.; PARENT, V.; MARSAC, C.; COHEN, D. and FROGUEL, P. (1994): Higher than paternal inheritance of diabetes in GK rats. *Diabetes*. 43: 220-224.
 - (29) GILL-RANDALL, R.; ADAMS, D.; OLLERTON, R. L.; LEWIS, M. and ALCOLADO, J. C. (2004): Type 2 diabetes mellitus – genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia*. 47: 1354-1359.
 - (30) KERVRAN, A.; GUILLAUME, M. and JOST, A. (1978): The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia*. 15: 387-393.

- (31) BIHOREAU, M. T.; KTORZA, A.; KINEBANYAN, M. F. and PICON, L. (1986): Impaired glucose homeostasis in adult rats from hyperglycemic mothers. *Diabetes*. 35: 979-984.
- (32) PATEL, M. S. and SRINIVASAN, M. (2002): Metabolic programming: causes and consequences. *J. Biol. Chem.* 277: 1629-1632.
- (33) GAUGUIER, D.; BIHOREAU, M. T.; KTORZA, A.; BERTHAULT, M. F. and PICON, L. (1990): Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats. *Diabetes*. 39: 734-739.
- (34) ABDEL-HALIM, S. M.; GUENIFI, A.; HE, B.; YG, B.; MUSTAFA, M.; HOJEBERG, B.; HILLERT, J.; BAKHIET, M. and EFENDIC, S. (1998): Mutations in the promoter of adenylylcyclase (AC)-III gene, overexpression of AC-III mRNA and enhanced cAMP generation in islets from the spontaneously diabetic GK rat model of Type2 diabetes. *Diabetes*. 47: 498-504.
- (35) GALLI, J.; LI, S.; BARNARD, C.; OSTENSON, C. G.; JIAO, H.; FAKHRAID-RAD, H.; JACOB, H. J.; LANDER, E. S. and LUTHMAN, H. (1996): Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nature Genet.* 12: 31-37.
- (36) WALLIS, R. H.; WALLACE, K. J.; COLLINS, S. C.; McATEER, M.; ARGLOUD, K.; BIHOREAU, M. T.; KAISAKI, P. J. and GAUGUIER, D. (2004): Enhanced insulin secretion and cholesterol metabolism in congenic strains of the spontaneously diabetic (type2) Goto Kakizaki rat are controlled by independent genetic loci in rat chromosome 8. *Diabetologia*. 47: 1096-1106.
- (37) LIN, J. M.; ORTSÄTER, H.; FAKHRAID-RAD, H.; GALLI, J.; LUTHMAN, H. and BERGSTEN, P. (2001): Phenotyping of individual pancreatic islets locates genetic defects in stimulus secretion coupling to Niddm1 within the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes*. 50: 2737-2743.
- (38) DRUCKER, D. J. (2006): The biology of incretin hormones. *Cell. Metabolism*. 3: 1531-165.
- (39) TOURREL, C.; BAILBÉ, D.; LACORNE, M.; MEILE, M. J.; KERGOAT, M. and PORTHA, B. (2002): Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with Glucagon-like peptide-1 or Exendin-4. *Diabetes*. 51: 1452-1452.
- (40) DOLZ, M.; BAILBÉ, D.; MOVASSAT, J.; LE STUNFF, H.; KASSIS, N.; GIROIX, M. H. and PORTHA, B. (2006): Pivotal role of cAMP in the acute restitution of defective glucose-stimulated insulin release in diabetic GK rat by GLP-1. *Diabetes*. 55: Suppl 1, A371.

————— *Artículo original* —————

Cinética de la estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA. Influencia de la temperatura

Recibido el 20 de marzo de 2007

OLIVARES PALLEROLS, R.¹; ROMERO OTERO, M.¹
y MORENO FRIGOLS, J. L.^{1, 2 *}

¹*Servicio de Radioisótopos.*

Hospital Clínico Universitario de Valencia.

²*Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Universidad de Valencia.*

RESUMEN

La pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA en función del tiempo se estudia por radiocromatografía en las primeras horas transcurridas tras su preparación. Los resultados se ajustan a ecuaciones exponenciales indicativas de que la degradación del radiofármaco sigue una cinética de orden uno. Las constantes obtenidas a diferentes temperaturas siguen la ecuación de Arrhenius, cuyos parámetros se calculan. Se proponen sendos métodos, analítico y gráfico, para el cálculo del tiempo de validez (t_{95}) en función de la temperatura.

Palabras clave: Pureza radioquímica.—Cálculo Tiempo Validez.

* Doctor José Luis Moreno Frigols.
Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).
Telf.: +34963543289. Fax: +34963544892.
e.mail: Jose.L.Moreno@uv.es

ABSTRACT**Stability kinetics of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc -DTPA.
Influence of the temperature**

The radiochemical purity of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc -DTPA depending on the time is studied by radiocromatography in the first hours passed after its preparation. Results adjust to exponential equations that indicate order one for the degradation of radiopharmaceutical. The constants obtained for different temperatures follow the equation of Arrhenius, whose parameters are calculated. Analytical and graphical methods are provided for the calculation of the validity time (t_{95}) depending on temperature.

Key words: Radiochemical Purity.—Validity Time Calculation.

INTRODUCCIÓN

El ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA) reacciona con el ^{99m}Tc reducido para formar un complejo con carga negativa en disoluciones neutras o ligeramente ácidas (1, 2).

Después de la administración intravenosa, el ^{99m}Tc -DTPA es aclarado rápidamente de la circulación por filtración glomerular. La retención renal es del 7% de la dosis inyectada al cabo de una hora y el 95% es excretado en las primeras 24 horas (3).

Los kits comerciales de DTPA se preparan generalmente con la sal pentasódica o cálcico-trisódica de DTPA conteniendo una cantidad apropiada de cloruro estannoso dihidratado en forma liofilizada bajo atmósfera de nitrógeno. El marcaje se realiza añadiendo $^{99m}\text{TcO}_4^-$ al vial y mezclando. Usando ^{99}Tc en cantidades milimolares se ha demostrado que en el ^{99m}Tc -DTPA preparado por reducción con ión estannoso el estado de oxidación del tecnecio es +4. Sin embargo, no se sabe si estos datos pueden extrapolarse a la concentración trazadora del ^{99m}Tc en el ^{99m}Tc -DTPA (4, 5).

Las aplicaciones principales de este radiofármaco son:

- Estudio de la función renal.
- Medida de la velocidad de filtración glomerular (GFR).
- Evaluación de uropatía obstructiva.

- Detección y localización de hemorragias gastrointestinales.
- Evaluación de las complicaciones en el trasplante renal.
- Preparación de aerosoles para estudios de ventilación pulmonar.
- Estudios cerebrales y pérdidas de fluido cerebroespinal.

Para la medida del GFR el ^{99m}Tc -DTPA debe ser usado dentro de la hora siguiente a su preparación, pues la degradación del radiofármaco puede aumentar el fondo sanguíneo, produciendo un valor erróneo de GFR. Para los estudios del sistema nervioso central el radiofármaco debe ser ensayado específicamente en cuanto a la apirogenicidad, puesto que el sistema cerebroespinal es muy sensible a los pirógenos.

OBJETIVO

La pureza radioquímica es un parámetro fundamental en el control de calidad de los radiofármacos. Se define como el tanto por ciento de la actividad en la forma química adecuada con respecto a la actividad total. Las impurezas radioquímicas proceden de la descomposición debida a la acción del disolvente, cambios en la temperatura o el pH, luz, presencia de agentes oxidantes o reductores y radiolisis. En el caso concreto de los radiofármacos marcados con ^{99m}Tc , las impurezas radioquímicas más frecuentes son el $^{99m}\text{TcO}^{4-}$ libre y el ^{99m}Tc hidrolizado.

Este trabajo se presenta como un primer paso en una línea que pretende la caracterización cinética de la degradación de los radiofármacos de ^{99m}Tc , ya que los datos obtenidos en la bibliografía se limitan, en la mayoría de los casos, a recomendar empíricamente la utilización en las primeras horas (generalmente 3-4) siguientes a la preparación. Hemos elegido el ^{99m}Tc -DTPA, pues los tanteos previos nos indicaron que este radiofármaco presenta especiales problemas de estabilidad, y la temperatura como la primera variable a estudiar por ser la de efectos más evidentes, aunque es nuestro propósito ampliar el estudio en el futuro a otros radiofármacos y otras variables, tales como pH, fuerza iónica, viscosidad del medio, etc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y productos químicos

Pentacis® suministrado por CIS bio international B.P. 32-F-91192 Gif-sur-Yvette Cedex.

Contenido por vial:

- Dietilentriaminopentaacetato trisódico y cálcico: 9.10 mg.
- Dihidrocloruro de estaño: 0.45 mg.

Disolución isotónica, estéril y apirógena de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$. Suministrada por Molypharma, S. A.

Metil etil cetona (MEK) Suministrada por Guinama.

Tiras cromatográficas ITLCTMSG P/N 61885 de fibra de vidrio recubiertas con gel de sílice. Suministradas por Pall Corporation.

Aparatos

Baño termostático Tectron Bio Selecta.

Radiocromatógrafo Mini Gita Raytest.

Estufa Selecta.

Procedimiento experimental

A un vial de DTPA se añadieron 1480 MBq (40 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ contenidos en 2 mL de disolución salina isotónica, estéril y apirógena. El vial, rodeado de un protector de plomo, se depositó en el baño termostático. Transcurridos los tiempos prefijados se tomó una muestra del contenido del vial con una jeringa de insulina y se depositó una gota ($\approx 5 \mu\text{L}$) a 2 cm del borde de una tira cromatográfica de 10 cm de longitud previamente activada en estufa a 110°C durante 60 minutos. Se realizó un desarrollo cromatográfico con metil etil cetona (6) durante cinco minutos, al cabo de los cuales la tira se ex-

trajo de la cubeta, se secó y se rastreó en el radiocromatógrafo, el cual suministró directamente el valor de la pureza radioquímica expresada en tanto por ciento. Los resultados se analizaron mediante el programa informático Excel, verificando el ajuste de la pureza radioquímica frente al tiempo. Como criterios para la calidad del ajuste se utilizaron el coeficiente de correlación (r) y la suma de los cuadrados de los residuales (σ).

RESULTADOS

La Figura 1 muestra un típico radiocromatograma.

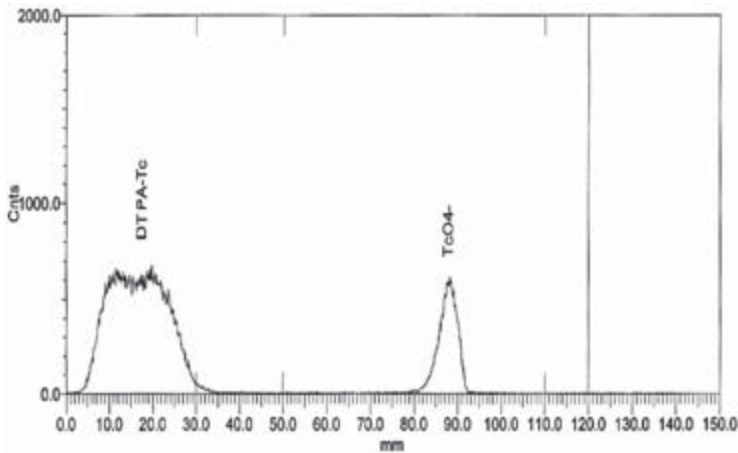


FIGURA 1. *Radiocromatograma obtenido a los 270 minutos de la preparación y 40° C. Se observan los picos correspondientes al complejo ^{99m}Tc -DMSA y al tecnecio libre (TcO_4^-).*

Las purzas radioquímicas (P) se obtuvieron automáticamente a partir de los radiocromatogramas. Su evolución, en función del tiempo para distintas temperaturas, se muestra en la Figura 2.

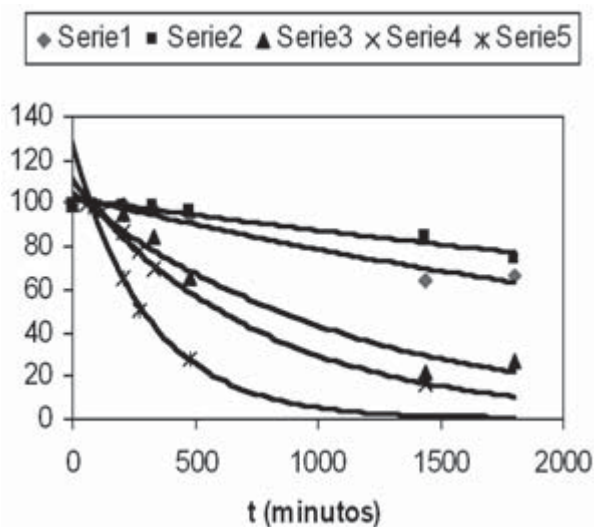


FIGURA 2. Evolución con el tiempo de la pureza radioquímica (P) para distintas temperaturas: Serie 1: 4° C, Serie 2: 20° C, Serie 3: 37° C, Serie 4: 40° C, Serie 5: 58° C.

DISCUSIÓN

Análisis de los resultados

Las gráficas de la Figura 2 se ajustan a las ecuaciones de velocidad expuestas en la Tabla 1:

TABLA 1

<i>T</i> (°C)	<i>Ecuación de velocidad</i>	
4	$P = 102,94 \cdot \exp(-0,0003 \cdot t)$	R = 0,974
20	$P = 101,76 \cdot \exp(-0,0002 \cdot t)$	R = 0,968
37	$P = 104,77 \cdot \exp(-0,0009 \cdot t)$	R = 0,966
40	$P = 110,87 \cdot \exp(-0,0013 \cdot t)$	R = 0,999
58	$P = 135,91 \cdot \exp(-0,0048 \cdot t)$	R = 0,990

Las ecuaciones de la Tabla 1 son todas ellas de la forma:

$$P = P_0 \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (1)$$

que corresponden a orden 1.

La constante de velocidad se relaciona con la temperatura a través de la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (2)$$

que en forma logarítmica se expresa como:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (3)$$

En la Figura 3 se observa el ajuste de las constantes de velocidad a la ecuación 3

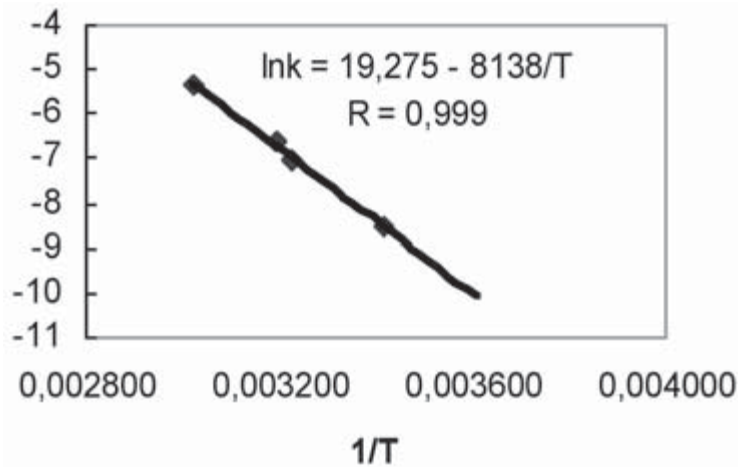


FIGURA 3. *Ajuste de las constantes de velocidad calculadas a la ecuación de Arrhenius.*

La dependencia de k con respecto a T en forma exponencial es:

$$k = 2.35 \cdot 10^8 \cdot \exp(-8138/T) \quad (4)$$

Tiempo de validez del radiofármaco

Se considera que el radiofármaco es útil mientras su pureza radioquímica sea igual o superior al 95%. De acuerdo con este criterio, puede definirse el parámetro t_{95} como el tiempo necesario para que la pureza radioquímica se reduzca al 95% de la inicial. Tal parámetro puede calcularse a partir de la ecuación (1):

$$95 = 100 \cdot \exp(-k \cdot t_{95}),$$

De donde se obtiene:

$$t_{95} = \ln(100/95)/k \quad (5)$$

Introduciendo en (5) la expresión de k dada por (4) resulta:

$$t_{95} = \ln(100/95) / 2.35 \cdot 10^8 \cdot \exp(-8138/T)$$

Que, finalmente, se transforma en:

$$t_{95} = 2.18 \cdot 10^{-10} \cdot \exp(8138/T) \quad (T = \text{Temperatura en K})$$

O bien:

$$t_{95} \text{ (minutos)} = 2.18 \cdot 10^{-10} \cdot \exp(8138/(T+273)) \quad (6)$$

(T= Temperatura en °C)

La Figura 4 muestra el valor de t_{95} calculado a partir de la ecuación 6 para temperaturas próximas al ambiente.

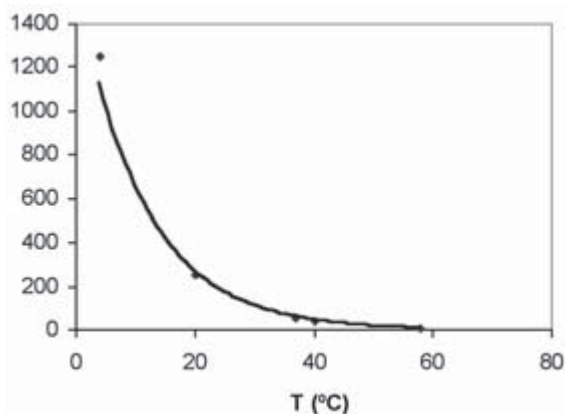


FIGURA 4. *Tiempo de validez del radiofármaco en función de la temperatura.*

CONCLUSIONES

- Como consecuencia del estudio realizado puede proponerse la aplicación directa de la ecuación (6) como método rápido para el cálculo del tiempo de validez del radiofármaco (t_{95}) en función de la temperatura.
- Un método alternativo sería la interpolación en la gráfica representada en la Figura 4.
- Por observación de la Figura 4 se deduce que el tiempo de validez es sumamente variable con la temperatura, pasando de valores considerables (alrededor de 800 minutos a 7° C) a otros mucho menores (alrededor de cuatro horas a temperatura ambiente), con una drástica disminución para temperaturas mayores de 30° C que exigiría su conservación en frigorífico en ambientes veraniegos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) EUROPEAN PHARMACOPOEIA (1997): Technetium (^{99m}Tc) pentetate injection 1602-1603.
- (2) RUSSEL, C. D.; CRITENDEN, R. C. and CASH, A. G. (1980): Ionic charge on ^{99m}Tc -DTPA and ^{99m}Tc -EDTA by column ion-exchange. *J. Nucl. Med.* 21: 354-360.
- (3) ARNOLD, R. W.; SUBRAMANIAN, G.; MCAFEE, J. G. *et al.* (1975): Comparison of ^{99m}Tc complexes for renal imaging. *J. Nucl. Med.* 16: 357-367.
- (4) RUSSEL, C. D. and SPEISER, A. G. (1982): Iminodiacetic complexes of technetium: an electrochemical study. *Int. J. Appl. Rad. Isot.* 33: 903-906.
- (5) SAHA, G. B. (1998): Characteristics of Specific Radiopharmaceuticals, ^{99m}Tc -Pentetate (DTPA), en *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, p. 117. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg.
- (6) BLASCO FERRÁNDIZ, R. F.; ESPUELAS FERNÁNDEZ, G.; PÉREZ IRUELA, J. A. *et al.* (2000): en *Manual de procedimientos rutinarios de controles de calidad radioquímicos para medicamentos radiofármacos de uso frecuente*. Nycomed Amersham, S. A. Tres Cantos (Madrid).

————— *Artículo original* —————

Are adrenomedullin positive modulators novel matrix metalloproteinase inhibitors?

Recibido el 28 de marzo de 2007

MARIO A. GARCÍA, SONSOLES MARTÍN-SANTAMARÍA,
ANA RAMOS, BEATRIZ DE PASCUAL-TERESA *
*Departamento de Química. Facultad de Farmacia,
Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe,
28668-Boadilla del Monte, Madrid (Spain)*

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs), are a family of structurally related zinc containing enzymes that play a major role in the breakdown of connective tissue and therefore, are targets for therapeutic inhibitors in many inflammatory, malignant, and degenerative diseases. On the other hand, it has been recently demonstrated that one of these enzymes, MMP-2, a type IV collagenase, termed gelatinase A, cleaves the angiogenic peptide adrenomedullin (AM) (1). AM is a peptide hormone that plays a critical role in several diseases such as diabetes, hypertension and cancer. In a High Throughput Screening (HTS) carried out at the National Cancer Institute (NCI), a series of AM modulators were identified, with an interesting hypotensive activity (2). In order to shed light into the mechanism of action of these interesting compounds, we have hypothesized that they may be

* Beatriz de Pascual-Teresa.

Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo CEU.

Ctra. Boadilla del Monte, km. 5,300. Boadilla del Monte. Madrid.

Phone: +34913724796. Fax: +34913724009 bpaster@ceu.es

Sonsoles Martín-Santamaría.

Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo CEU.

Ctra. Boadilla del Monte, km. 5,300. Boadilla del Monte. Madrid.

Phone: +34913724798 Fax: +34913724009 smar.fcex@ceu.es

Abbreviations: MMPs: Matrix metalloproteinases; AM: adrenomedullin; HTS: High Throughput Screening; NCI: National Cancer Institute.

affecting the biodisponibility of AM in the blood stream by inhibiting the MMP-2 protease activity. In the present work, we present a theoretical study, making use of molecular mechanics, docking and virtual screening techniques, with the aim of demonstrating this hypothesis. Biological evaluation of MMP-2 inhibition by some selected compounds, followed the computational work, leading us to propose a structurally new type of MMP-2 inhibitors, with possible interest as anticancer and antiangiogenic agents.

Key words: Zinc-binding-group (ZBG).—Docking.—Virtual screening.

RESUMEN

¿Son los moduladores positivos de adrenomedulina nuevos inhibidores de metaloproteasas de la matriz?

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) pertenecen a la familia de enzimas que contienen zinc y juegan un papel predominante en la degradación del tejido conectivo. Por ello se consideran dianas terapéuticas para procesos de inflamación y enfermedades malignas y degenerativas. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que un miembro de esta familia, MMP-2, una colagenasa de tipo IV también conocida como gelatinasa A, es capaz de degradar un péptido angiogénico denominado adrenomedulina (AM) (1). AM es una hormona peptídica que desarrolla un papel importante en diversas patologías como diabetes, hipertensión y cáncer. Se ha identificado mediante un cribado de alto rendimiento (HTS) de la colección de compuestos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), una serie de moduladores con interesante actividad hipotensora (2). El mecanismo de acción de estos moduladores es desconocido y nosotros proponemos que pueden afectar a la biodisponibilidad de la AM en el torrente sanguíneo por medio de la inhibición de la actividad de la MMP-2. En este trabajo presentamos un estudio teórico que hace uso de técnicas como mecánica molecular, *docking* y Cribado Virtual con el objetivo de demostrar esa hipótesis. A continuación del estudio computacional se llevó a cabo la evaluación biológica de algunos compuestos, permitiéndonos proponer un nuevo tipo de ZBG que puede ser interesante para el diseño de nuevos inhibidores de MMPS, con interés como agentes anticancerosos y antiangiogénicos.

Palabras clave: Grupo de unión al zinc.—Docking.—Cribado virtual.

INTRODUCTION

Matrix Metalloproteinases Classification

Matrix metalloproteinases (MMPs), also called matrixins, are a family of structurally related zinc-containing enzymes that mediate the breakdown of connective tissue and are therefore targets for therapeutic inhibitors in many inflammatory, malignant, and degenerative diseases (3).

The mammalian MMP family is now known to include at least 24 enzymes. The most studied are three collagenases: interstitial collagenase (MMP-1), neutrophil collagenase (MMP-8), and collagenase-3 (MMP-13). These enzymes can degrade the fibrillar collagens, which are generally resistant to proteolysis. The MMP family also includes two type IV collagenases, termed gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9), which can degrade type IV collagen of basal laminae, as well as other non helical collagen domains and proteins, such as fibronectin and laminin. Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) degrade various proteoglycan components of the extracellular matrix as well as fibronectin and laminin.

Several subsites have been described (S1, S2, S3, S1', S2', and S3') being responsible for different roles affecting activity and selectivity, depending on the MMP considered (4). These requirements can be satisfied by a variety of different structural classes of MMP inhibitors (MMPIs), which have been discovered by a number of methods, including structure-based design (5, 6) and combinatorial chemistry (7).

Proteolytic Reaction Mechanism

The proteolytic reaction of MMPs has been rationalized on the basis of structural information (Figure 1) (8). It has been proposed that the scissile amide carbonyl coordinates to the active site Zn^{2+} ion. This carbonyl is attacked by a water molecule that is simultaneously hydrogen bonded to a conserved glutamic acid

(Glu198 in MMP-8) and coordinated to the Zn^{2+} ion. The water donates a proton to the Glu residue that transfers it to the nitrogen of the scissile amide. This is followed by the Glu residue shuttling the remaining proton from the water molecule to the nitrogen of the scissile amide with resultant peptide bond cleavage. During this process, the positively charged Zn^{2+} ion helps to stabilize negative charge at the carbon of the scissile amide and a conserved Ala (Ala161 in MMP-8) residue helps to stabilize the positive charge at the nitrogen of the scissile amide.

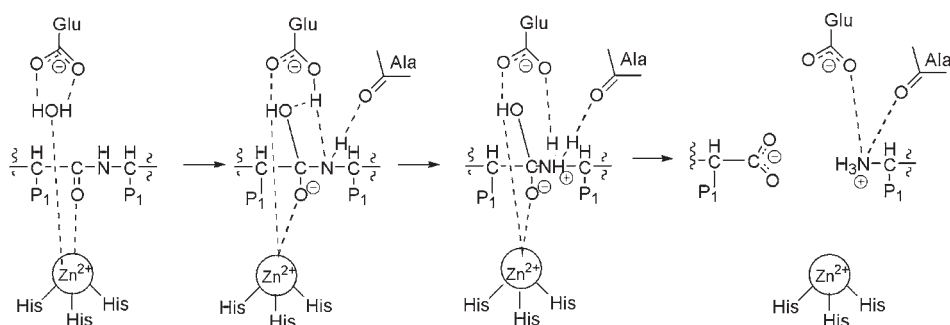


FIGURE 1. *Mechanism of proteolysis carried out by MMPs, as reported by Lovejoy et al.*

Biological Implications of MMPs

Matrix metalloproteinases are responsible of remodelling and degrading extracellular matrix, and are implicated in a wide variety of biological processes such as embryonic development, blastocyst implantation, nerve growth, ovulation, morphogenesis, angiogenesis, tissue resorption and remodelling, bone remodelling, apoptosis, cancer invasion and metastasis, arthritis (osteo- and rheumatoid-), atherosclerotic plaque rupturing, pulmonary emphysema, aortic aneurysms, breakdown of blood-brain barrier, periodontal disease, skin ulceration, corneal ulceration, gastric ulcer, multiple sclerosis, Crohn's disease, psoriasis, dermatitis, congestive heart failure and Alzheimer's disease (9).

Matrix Metalloproteinases Inhibitors (MMPIs)

Many groups of compounds are used as MMPs inhibitors. The requirements for a molecule to be an effective MMP inhibitor are: a) a functional group (e.g. carboxylic acid, hydroxamic acid, sulfhydryl, etc.) capable of chelating the catalytic Zn^{2+} ion (this will be referred as zinc binding group or ZBG); b) at least one functional group which provides a hydrogen bond interaction with the enzyme backbone; and c) one or more side chains that undergo effective van der Waals interactions with the enzyme subsites. These requirements can be satisfied by a variety of different structural classes of MMP inhibitors, which have been discovered by a number of methods, including structure-based design (5) and combinatorial chemistry (7).

Zn^{2+} -chelating hydroxamates have been the most frequently used ZBG in MMPI design, because of their higher ΔG values, but as shown below, a number of other groups are possible. However, strong Zn^{2+} -chelating moieties disproportionately drive binding mode and make the contributions from the rest of the compound smaller, reducing other opportunities for improved specificity. Indeed, it has been demonstrated that some hydroxamate derivatives bind many off-target metalloproteinases (MPs) that are not MMPs (10). This may be related to the lack of selectivity of hydroxamic acid for zinc over other divalent transition metals. The use of weaker zinc chelating groups would reduce the strength of zinc binding, and the optimization on the rest of the molecule should lead to nanomolar inhibitors. This means, that the design of MMPIs should be addressed individually in order to achieve selectivity.

The reported types of MMPIs include hydroxamates (succinyl hydroxamates, sulfonamide hydroxamates, reverse hydroxamates, naphthyl hydroxamates), non-hydroxamates (carboxylates and N-carboxyalkyl ZBGs, thiol ZBGs, phosphorus-based ZBGs), and miscellaneous natural products (7, 11).

Novel Zinc Binding Groups

In spite of the time and the money invested, and the numerous groups interested on the development of MMPIs based on the

described ZBGs (Table 1 summarises the most important ZBGs described in the literature), no MMPI has been licensed for treatment of cancer until date. This is mainly due to low activity, low selectivity, high toxicity, low bioavailability and/or low solubility. Only one MMPI, PeriostatTM (CollaGenex Pharmaceuticals, Inc.), a low-dose tetracycline derivative, is licensed for use in periodontitis and it is under clinical trials for other indications (12). Thus, research focused on the search of new ZBG becomes necessary.

TABLE 1. Summary of the most important Zinc Binding Groups (ZBGs) described in the literature (11). Atoms implicated in zinc coordination are displayed in bold format. ZBGs with unknown binding mode are displayed without bold atoms

Name	Representative Structure	Name	Representative Structure
Hydroxamate		Reverse Hydroxamate	
Carboxylate		Thiol	
Thiol carbonyl		Dithiol	
Phosphate		Phosphinate	
Carbamoyl Phosphonate		Tetracycline	
Hydrazide		Thiirane	
Barbiturate		Thiadiazine	

TABLE 1. Summary of the most important Zinc Binding Groups (ZBGs) described in the literature (11). Atoms implicated in zinc coordination are displayed in bold format. ZBGs with unknown binding mode are displayed without bold atoms (cont.)

Name	Representative Structure	Name	Representative Structure
Thiadiazole thione		Sulfodiimine	
Pyridone and Pyridinetione		Hydroxipirانونe and Hydroxipirانونanthinone	
Pyrimidin-carbonil		N-pyrimidin-amide	
Aminomethyl benzimidazole		Hydroxysulfonamide	
Pirrol carbonyl		Hydroxyurea	
Dipicolylamine		β -Lactam	
Squaric Acid (X=O, S)			

Several new ZBGs have been recently described (11). The hydrazide scaffold has also been described as a good ZBG, and exhibits potent selectivity for MMP-2 versus MMP-1. Brown et al. described a novel ZBG based on a thiirane moiety, which behaves similarly to TIMP-1 and TIMP-2, the natural tissue inhibitors of MMPs (13). Barbiturates have also been cocrystallized (PDB code: 1g4k) in complex with MMP-3 but no information on the activity as

MMPI has been reported to date. A selective inhibitor of MMP-9 has been obtained using a thiadiazine scaffold, and a similar ZBG, the thiadiazole thione, has been analyzed in the catalytic site of MMP-3. Browner et al. investigated the differences among three identical compounds bearing different ZBGs (hydroxamate, carboxylate and sulfodiimines, crystalized in complex with MMP-7), concluding that the binding potency differences among them were consequence of the geometry adopted by the ZBG chelating the zinc atom (14). Another theoretical study showed that pyridone analogues can behave as ZBGs as well. Also, the aminomethyl benzimidazole group has been described as a ZBG with micromolar activity.

Others ZBGs not described by Rao et al. include hydroxysulfonamides (15), hydroxyureas (16), dipicolylamines (17), β -lactams (18) and squaric acids (18). Additionally, 3D structures of many MMP-Inhibitor complexes, solved either by X-ray diffraction or NMR techniques, have shown that the different chelating ZBGs coordinate catalytic zinc ion most frequently in a pentacoordinated way (19).

Binding of MMPIs is not only explained by coordination of the ligand ZBG to the catalytic zinc ion. Binding and, more importantly, selectivity, have been addressed by interactions with key residues belonging to different subsites, specially the S1' region. Thus, extensive hydrophobic interactions between the lipophilic moieties of the ligands and the S1' pocket can be largely responsible for the binding potencies (20).

Since a combination of factors, including the nature of ZBG, scaffolds and side chains that occupy different subsites, influence the selectivity and that the structural differences between MMPs take place mainly in the S1' sub-site, all these features will have to be taken into account in order to design compounds with the desired selectivity.

Working Hypothesis: Can AM positive modulators be MMP2 inhibitors?

Matrix metalloproteinases are responsible of degrading several components of the extracellular matrix (ECM), among other proteins

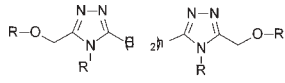
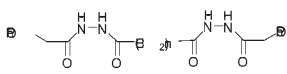
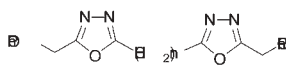
and peptides of the extracellular medium as mentioned before. Adrenomedullin (AM), a 52 amino acid peptide isolated from a human pheochromocytoma (adrenal tumour) (21), is an interesting example of MMP substrate. Martínez *et al.*, have reported how the adrenomedullin is cleaved by MMP-2 (1). Interestingly they also report that AM is not cleaved by MMP-9, so MMP-2 may be considered as a specific protease of AM.

Our group has identified by a HTS a series of compounds that modulate the activity of adrenomedullin (Table 2) (22). These compounds have demonstrated to increase the production of cAMP, the second messenger released upon binding of AM to its receptor, but, interestingly, only in presence of the AM peptide. Furthermore, they are able to bind to AM but there is no direct relationship between the affinity to AM and the amount of cAMP production. These facts led us to the hypothesis that the mechanism of action of these compounds may involve affecting the availability of AM. That is, modulators of AM could inhibit the MMP-2 protease activity, so, the AM levels would be increased and consequently the cAMP production would be elevated. This work tries to shed light into the possibility that AM modulators and some derivatives could act as matrix metalloproteinases inhibitors. This hypothesis could drive, not only to an explanation of the mechanism of action of the modulators, but also to the discovery of novel ZBGs which could be exploited for the design of potent and selective inhibitors for MMP-2.

TABLE 2. Positive AM modulators and related compounds, that were used in the computational study

Series 1				Series 2		Series 3	
compd	<i>n</i>	R	R'	compd	<i>n</i>	compd	<i>N</i>
1a	8	Ph	NH-Ph	2j	4	3j	4
1b	8	<i>p</i> -Cl-phenyl	NH ₂	2k	5	3k	5

TABLE 2. Positive AM modulators and related compounds, that were used in the computational study (cont.)

											
Series 1		Series 2		Series 3							
compd	<i>n</i>	R	R'	compd	<i>n</i>	compd	<i>N</i>				
1c	8	<i>o</i> , <i>p</i> -diCl-phenyl	NH ₂	2l	6	3l	6				
1d	8	1-hydroxi-2-naphtyl	NH ₂	2m	7	3m	7				
1e	8	2-hydroxi-1-naphtyl	NH ₂	2n	8	3n	8				
1f	8	<i>p</i> -Cl-phenyl	NH-Ph								
1g	8	<i>o</i> , <i>p</i> -diCl-phenyl	NH-Ph								
1h	8	1-hydroxi-2-naphtyl	NH-Ph								
1i	8	2-hydroxi-1-naphtyl	NH-Ph								
1j	4	Ph	CH ₂ Ph								
1k	5	Ph	CH ₂ Ph								
1l	6	Ph	CH ₂ Ph								
1m	7	Ph	CH ₂ Ph								
1n	8	Ph	CH ₂ Ph								

MATERIALS AND METHODS

Macromolecule Selection

The 3D superimposition of the eleven different models of the 1hov against 1ck7 and 1qib (see Table 3) was carried out using Sybyl7.2 (23).

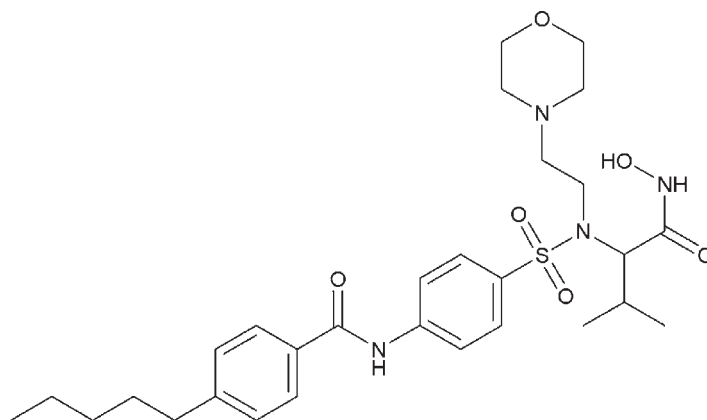
TABLE 3. *Different entries of the MMP-2 deposited in the Protein Data Bank*

Pdb Code	Information	Experimental Method and Resolution	Reference
1ck7	Full length protein	X-Ray (2.80 Å)	(35)
1eak	Catalytic domain (inactive and mutant)	X-Ray (2.66 Å)	(36)
1qib	Catalytic domain with the inhibitor Batimastat (not resolved)	X-Ray (2.80 Å)	(37)
1gxd	ProMMP-2/TIMP-2 complex (inactive)	X-Ray (3.10 Å)	(38)
1hov	Catalytic domain with inhibitor SC-74020 (i52) complex	NMR (11 models)	(32)

All models were selected for docking procedures. For docking purposes, the protonation state of histidines and glutamates in the binding site was maintained as it was in the NMR structure. Both zinc and calcium heteroatoms were kept throughout the docking study.

Ligand Processing

All the ligands (series 1, 2 and 3, together with compound i52; Figure 2 and Table 2) were used in its neutral protonation state. Assignment of the atom types and charge calculations were performed by using Sybyl 7.2. A conformational analysis was first performed to all compounds to be docked by use of the program Macromodel (24) and the Monte Carlo methodology. The parameters given to Macromodel were set to default with some exceptions. The force field selected was OPLS-AA. GS/SA solvation model was selected. The program was set to explore through 1000 steps modifying three torsional angles each step. The limit of acceptance was set to 50 kJ/mol above the instant minimum found. The minimization method selected was conjugated gradient. The convergence RMS was set to a limit of 2 Å. The criteria of minimization convergence was set to 0.05 kJ/ Å-mol.

FIGURE 2. *Chemical structure of compound i52.*

Superimposition

All the conformers resulting from the conformational search were then superimposed to the ligand i52 (Figure 2) present in the 1hov structure. This ligand was previously submitted to the same conformational search analysis and followed the same superimposition procedure in order to validate the methodology. The criteria selected for the superimposition was the maximum number of atoms fitted using the CSR program (25). Only the conformers with the higher number of atoms fitted were selected for the docking studies. The RMSD average of the selected ligands by superimposition to i52 was 0.9345 ± 0.2543 .

Docking

The docking studies were carried out using AutoDock 3.0 program (26). Two different parameter sets for the zinc ion were used: the implicit parameters for the zinc inside AutoDock program, and the Stote and colleagues (27) which means $r = 1.1 \text{ \AA}$, $\epsilon = 0.25 \text{ kcal/mol}$ and a formal charge of +2e. Very slight differences were observed within both protocols (data not shown).

The Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) was used as the search engine. The active site was defined using AutoGrid. The grid size was set to 128 x 60 x 60 points with a grid spacing of 0.375 Å centered on the catalytic zinc of each 1hov model. Step sizes of 2 Å for translation and 60° for rotation were chosen. The maximum number of energy evaluations was set to 250000. For each of the 100 independent runs, a maximum number of 27000 LGA operations were generated on a single population of 100 individuals. The compounds were studied with no restraints between the ZBG and the zinc atom. Other variables were set by using AutoDock Tools (ADT) (26).

Perl-based Filter

A perl program was developed in order to classify the compounds into three different categories depending on the coordination with the zinc ion: trigonal bipyramide coordination, square-based pyramide coordination and no coordinating compound using the mean atom distance and angles displacement published by Alberts and colleagues (Figure 3) (28).

Biological Assays

The MMP-2 Colorimetric Drug Discovery Kit (purchased from Biomol International, Lp., Exeter, UK) was selected for the biological evaluation of MMP-2 inhibition by the selected compounds 1n, 2m and 2n. Inhibition assays were carried out in duplicate at four different concentrations (100 µM, 25 µM, 6.5 µM and 3.25 µM). The inhibitor NNGH (29) was also included as a prototypic control inhibitor. A commercially available negative control, with reported no MMP inhibitory activity, was treated similarly (30).

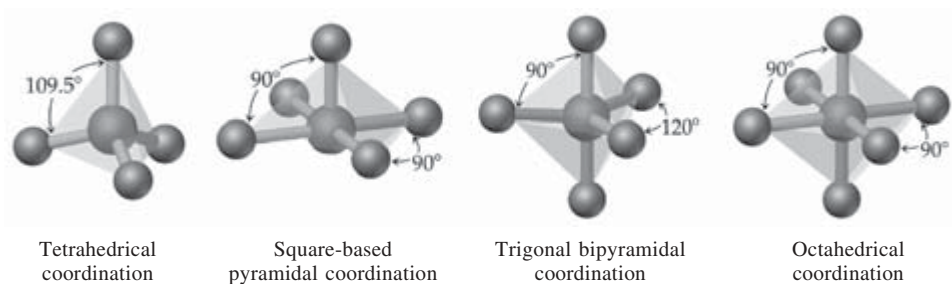


FIGURE 3. *Different geometries for the coordination of the Zn^{2+} ion found in the bibliography for proteases zinc-dependent.* MMPs are found to coordinate by square-based pyramidal or trigonal bipyramidal geometry (19, 28). Zinc is the center ion and the donor atoms are in coordinating position. Coordinating atoms in MMP are 3 His and one or two atoms of the ligand.

RESULTS

MMP-2 Selection

Five structures corresponding to MMP-2 subtype metalloproteinase are found in the Brookhaven Protein Data Bank (31), as shown in Table 3. No X-ray structures of MMP-2-Inhibitor complexes have been reported so far, and the PDB codes 1ck7 and 1qib corresponding to active MMP-2 exhibit low resolution values (2.80 Å). Only the NMR structure with PDB code 1hov corresponds to a complex with a hydroxamic acid inhibitor (i52, see Figure 2). For this reason it was considered as the host structure for docking purposes. The eleven models that contain the PDB 1hov (M1, M2,... M11) were considered in the subsequent docking studies, as it would allow to reflect the dynamic nature of MMP-2 in an aqueous environment.

Conformational Search and Docking

The series of compounds is characterized by the hydrocarbonated chain that joins the two potential ZBG, which means, that all compounds have at least 10 rotatable bonds. A torsional problem has been reported finding good docked hits when the rotatable

bonds of the ligands were more than 10 (19). Trying to minimize this difficulty, all compounds (1a to 3n) were submitted to a conformational search using Macromodel in order to get the maximum conformational diversity. The conformational search of all compounds led to very similar conformers in terms of energy and, in general, non-extended conformations as the most stable ones.

AutoDock was selected as the program to be used in the docking procedures. The selection was based on its wide use in similar cases described in the literature. In order to validate AutoDock as a docking tool, the first ligand that followed this protocol (conformational search, superimposition and docking) was compound i52 (32), the ligand present in 1hov structure in the complex with MMP-2. AutoDock was able to reproduce the NMR results and to predict the conformation in which i52 is bound inside the MMP-2 active site.

Data Analysis

A perl-based program was developed to filter the vasta amount of data generated. Distances and the angles between the ZBG, the three catalytic histidines and the zinc ion, were calculated from the docking results. Further analysis of the data allowed the identification of the docked geometries with the adequate coordination. For the MMP family, the pentacoordinated zinc has been shown to be the most frequent coordination state (19), with two possible geometries: trigonal bipyramide or square-based pyramide. Both possibilities were scanned by the perl filter. The analysis was set to a first limit of 2.53 Å of distance, and 0° of variation from the angles described in the literature (28). The distance of 2.53 Å is the maximum reported distance between a coordinating atom and the Zn²⁺ reported for MMPs.

Following this protocol, 98 conformers were found to be able to coordinate Zn ion inside any of the 11 NMR models. Table 4 shows the ability of these compounds to bind the MMP-2 active site. Complex MMP-2:i52 was submitted to the same perl filter leading to only two positive hits. A detailed analysis of the 11 NMR complex models, led to the observation that only models 1 and 3 fulfilled the required distance and angle restrictions found in the literature for

zinc coordination. A positive hit for one compound is considered when at least one of its conformers is able to coordinate the zinc ion, for one of the NMR models, taking into account the distances and angles restrictions described above. Eleven is then the maximum of possible positive hits for each compound. Using this procedure, we found 59 positive hits within a maximum of 264 (24 compounds * 11 models). AutoDock predicted that all compounds were able to coordinate the zinc atom at least in one of the eleven NMR models and at least in one conformation, except compound 1g.

TABLE 4. *Number of positive hits through the eleven NMR models resolved for 1h_{ov} in Protein Data Bank for each docked compound*

<i>Compound</i>	<i>Number of positive hits</i>	<i>Compound</i>	<i>Number of positive hits</i>	<i>Compound</i>	<i>Number of positive hits</i>	<i>Compound</i>	<i>Number of positive hits</i>
1a	1	1j	3	2j	5	3j	5
1b	2	1k	2	2k	3	3k	3
1c	1	1l	3	2l	2	3l	2
1d	2	1m	3	2m	5	3m	1
1e	2	1n	4	2n	2	3n	3
1f	1						
1g	0					i52	2
1h	2						
1i	2						

MMP-2 inhibitors should not only be good zinc coordinating agents, but also they should interact with key amino acids which are crucial for the ligand binding (7, 33, 34). Taking into account this information, the 98 positive docking hits were visually inspected displaying the residues within 4 Å around the ligand. Thus, residues belonging to S1, S2, S3, S1', S2', and S3' subsites were analyzed looking for putative interactions with each of the 98 conformers (data not shown). Compound i52 was included in this analysis to provide a reference for contacts with the residues belonging to the different subsites. Interactions with S1' residues were used as a filter to select 27 docking conformers, belonging to 15 different

compounds, as those which better fulfilled the interactions' pattern exhibited by i52. These results are displayed in Figure 4.

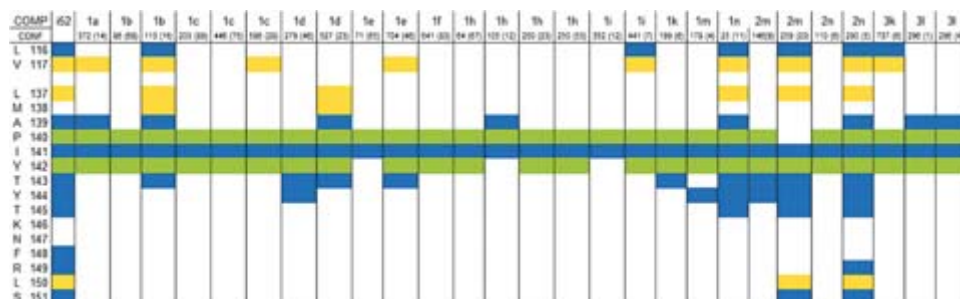


FIGURE 4. *Representation of the pattern of interaction between the 27 docking conformers analyzed and the amino acids of S1' subpocket of MMP-2 (position in the energy ranking in Autodock is given in parenthesis). Conserved amino acids are colored yellow. No conserved amino acids are colored blue. Amino acids that are reported to be able to establish hydrogen bonds are colored green. Compound i52 from the PDB 1hov is also included as a reference.*

Compounds 1n, 2m and 2n were the most promising candidates to perform MMP-2 inhibition assays, because they showed a similar S1' sub-site contacts pattern to that of i52. These interactions included unique residues to MMP-2, as Ala139, Thr 143, Tyr144, and Thr145, and were not observed for the other docking conformers. Figure 5 shows the resulting docking for 1n (blue) superimposed to i52 (orange).

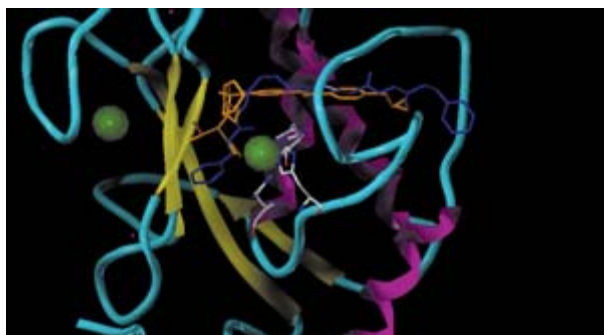


FIGURE 5. *Docking result for 1n (blue) in comparison with i52 (orange) resolved by NMR. 1n is able to coordinate Zn²⁺ occupying the same sub-sites as i52.*

Biological Assays

According to the computational work, preliminary MMP-2 inhibition assays were carried out in duplicate for compounds 1n, 2m and 2n. Only 1n showed an interesting MMP-2 inhibitory activity. Preliminary data show the decrease of the MMP-2 activity in the presence of 1n, suggesting that this compound may be a promising MMP-2 inhibitor. Unexpectedly, compounds 2m and 2n did not show detectable MMP-2 inhibition. It has to be taken into account that these two compounds are synthesis intermediates, so their character as positive/negative AM modulators has not been determined yet. AM affinity studies are currently in progress.

CONCLUSION

In this work we have carried out a theoretical study making use of molecular mechanics, docking and molecular dynamics techniques with the aim of demonstrating that positive modulators of AM, may be acting as MMP-2 inhibitors as a possible mechanism of action. This hypothesis has proven to be correct, according to our theoretical studies, since almost all compounds evaluated are able to bind MMP-2 in some of the conformations considered, by chelating the zinc ion and interacting with key aminoacids in the binding site of this enzyme. This ability and versatility to coordinate Zn^{2+} ion seems to be a prominent feature of this family of compounds not described before, to the best of our knowledge. Additionally, the moderated electron donor character of the aryloxi oxygen and the heterocyclic nitrogen, makes this family of compounds an excellent alternative ZBG to hydroxamic acids, where the pronounced zinc chelating properties may cause lack of specificity. Biological evaluation of MMP-2 inhibition by some selected compounds, selected according to the previous theoretical work, has shown that compound **1n** possesses an interesting inhibitory activity.

Interestingly, the ZBG contained in this compound, does not appear in any of the many MMP2 inhibitors reported in the bibliography. This finding opens up an unexplored structural field

for the search of MMP-2 inhibitors with interest for the treatment of many inflammatory, malignant, and degenerative diseases.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Spanish Ministry of Education (SAF2005-02608). S. M.-S. thanks Ministerio de Educación y Ciencia for a Ramón y Cajal contract. Grant to M. A. G. from Comunidad Autónoma de Madrid is also acknowledged.

BIBLIOGRAPHY

- (1) MARTÍNEZ, A.; OH, H. R.; UNSWORTH, E. J.; BREGONZIO, C.; SAAVEDRA, J. M.; STETLER-STEVENSON, W. and CUTTITA, F. (2004): Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem. J.* 383: 1-6.
- (2) MARTÍNEZ, A.; JULIAN, M.; BREGONZIO, C.; NOTARI, L.; MOODY, T. and CUTTITA, F. (2004): Identification of vasoactive non-peptidic positive and negative modulators of adrenomedullin using a neutralizing antibody-based screening strategy. *Endocrinology* 145: 3858-3865.
- (3) JOHNSON, L. L.; DYER, R. and HUPE, D. J. (1998): Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 466-471.
- (4) PIRARD, B. and MATTER, H. (2006): Matrix metalloproteinase target family landscape: a chemometrical approach to ligand selectivity based on protein binding site analysis. *J. Med. Chem.* 49: 51-69.
- (5) BABINE, R. E. and BENDER, S. L. (1997): Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* 97: 1359-1472.
- (6) VERMA, R. P. and HANSCH, C. (2007): Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 2223-2268.
- (7) WHITTAKER, M.; FLOYD, C. D.; BROWN, P. and GEARING, A. J. (1999): Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 99: 2735-2776.
- (8) LOVEJOY, B.; HASSELL, A. M.; LUTHER, M. A.; WEIGL, D. and JORDAN, S. R. (1994): Crystal structures of recombinant 19-kDa human fibroblast collagenase complexed to itself. *Biochemistry (Mosc.)* 33: 8207-8217.
- (9) SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T. (2000): Protease inhibitors: Synthesis of potent bacterial collagenase and matrix metalloproteinase inhibitors incorporating N-4-nitrobenzylsulfonylglycine hydroxamate moieties. *J. Med. Chem.* 43: 1858-1865.

- (10) SAGHATELIAN, A.; JESSANI, N.; JOSEPH, A.; HUMPHREY, M. and CRAVATT, B. F. (2004): Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10000-10005.
- (11) RAO, B. G. (2005): Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr. Pharm. Des.* 11: 295-322.
- (12) WYNN, R. L. (1999): Latest FDA approvals for dentistry. *Gen. Dent.* 47: 19-22.
- (13) BROWN, S.; BERNARDO, M. M.; LI, Z. H.; KOTRA, L. P.; TANAKA, Y.; FRIDMAN, R. and MOBASHERY, S. (2000): Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 6799-6800.
- (14) BROWNER, M. F.; SMITH, W. W. and CASTELHANO, A. L. (1995): Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry (Mosc.)* 34: 6602-6610.
- (15) SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T. (2000): Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors: sulfonylated amino acid hydroxamates with MMP inhibitory properties act as efficient inhibitors of CA isozymes I, II, and IV, and N-hydroxysulfonamides inhibit both these zinc enzymes. *J. Med. Chem.* 43: 3677-3687.
- (16) MICHAELIDES, M. R.; DELLARIA, J. F.; GONG, J.; HOLMS, J. H.; BOUSKA, J. J.; STACEY, J.; WADA, C. K.; HEYMAN, H. R.; CURTIN, M. L.; GUO, Y.; GOODFELLOW, C. L.; ELMORE, I. B.; ALBERT, D. H.; MAGOC, T. J.; MARCOTTE, P. A.; MORGAN, D. W. and DAVIDSEN, S. K. (2001): Biaryl ether retrohydroxamates as potent, long-lived, orally bioavailable MMP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1553-1556.
- (17) KIKUCHI, K.; KOMATSU, K. and NAGANO, T. (2004): Zinc sensing for cellular application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 182-191.
- (18) ONARAN, M. B.; COMEAU, A. B. and SETO, C. T. (2005): Squaric acid-based peptidic inhibitors of matrix metalloprotease-1. *J. Org. Chem.* 70: 10792-10802.
- (19) HU, X.; BALAZ, S. and SHELVER, W. H. (2004): A practical approach to docking of zinc metalloproteinase inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* 22: 293-307.
- (20) SKILES, J. W.; GONNELLA, N. C. and JENG, A. Y. (2001): The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 8: 425-474.
- (21) KITAMURA, K.; KANGAWA, K.; KAWAMOTO, M.; ICHIKI, Y.; NAKAMURA, S.; MATSUO, H. and ETO, T. (1993): Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 553-560.
- (22) GARCÍA, M. A.; MARTÍN-SANTAMARÍA, S.; CACHO, M.; DE LA LLAVE, F. M.; JULIAN, M.; MARTÍNEZ, A.; DE PASCUAL-TERESA, B. and RAMOS, A. (2005): Synthesis, biological evaluation, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of small-molecule positive modulators of adrenomedullin. *J. Med. Chem.* 48: 4068-4075.
- (23) SYBYL, version 7.2.; Tripos.: St. Louis, Missouri, 1999.
- (24) MOHAMADI, F.; RICHARDS, N. G. J.; GUIDA, W. C.; LISKAMP, R.; LIPTON, M.; CAUFIELD, C.; CHANG, G.; HENDRICKSON, T. and STILL, W. C. (1990): MacroModel

- An Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics. *J. Comput. Chem.* 11: 440-467.
- (25) PETITJEAN, M. (1998): Interactive maximal common 3D substructure searching with the combined SDM/RMS algorithm. *Computers & Chemistry* 22: 463-465.
- (26) MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K. and OLOSIN, A. J. (1998): Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19: 1639-1662.
- (27) STOTE, R. H. and KARPLUS, M. (1995): Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation. *Proteins* 23: 12-31.
- (28) ALBERTS, I. L.; NADASSY, K. and WODAK, S. J. (1998): Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci.* 7: 1700-1716.
- (29) MACPHERSON, L. J.; BAYBURT, E. K.; CAPPARELLI, M. P.; CARROLL, B. J.; GOLDSTEIN, R.; JUSTICE, M. R.; ZHU, L.; HU, S.; MELTON, R. A.; FRYER, L.; GOLDBERG, R. L.; DOUGHTY, J. R.; SPIRITO, S.; BLANCUZZI, V.; WILSON, D.; O'BYRNE, E. M.; GANU, V. and PARKER, D. T. (1997): Discovery of CGS 27023A, a non-peptidic, potent, and orally active stromelysin inhibitor that blocks cartilage degradation in rabbits. *J. Med. Chem.* 40: 2525-2532.
- (30) DANIELS, J. T.; SCHULTZ, G. S.; BLALOCK, T. D.; GARRETT, Q.; GROTENDORST, G. R.; DEAN, N. M. and KHAW, P. T. (2003): Mediation of transforming growth factor-beta(1)-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring. *Am. J. Pathol.* 163: 2043-52.
- (31) BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N. and BOURNE, P. E. (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.
- (32) FENG, Y. Q.; LIKOS, J. J.; ZHU, L. M.; WOODWARD, H.; MUNIE, G.; MCDONALD, J. J.; STEVENS, A. M.; HOWARD, C. P.; DE CRESCENZO, G. A.; WELSCH, D.; SHIEH, H. S. and STALLINGS, W. C. (2002): Solution structure and backbone dynamics of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 1598: 10-23.
- (33) LUKACOVA, V.; ZHANG, Y.; MACKOV, M.; BARICIC, P.; RAHA, S.; CALVO, J. A. and BALAZ, S. (2004): Similarity of binding sites of human matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 279: 14194-14200.
- (34) TAKAHASHI, K.; IKURA, M.; HABASHITA, H.; NISHIZAKI, M.; SUGIURA, T.; YAMAMOTO, S.; NAKATANI, S.; OGAWA, K.; OHNO, H.; NAKAI, H. and TODA, M. (2005): Novel matrix metalloproteinase inhibitors: Generation of lead compounds by the in silico fragment-based approach. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 4527-4543.
- (35) MORGUNOVA, E.; TUUTTILA, A.; BERGMANN, U.; ISUPOV, M.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, G. and TRYGGVASON, K. (1999) Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: Activation mechanism revealed. *Science* 284: 1667-1670.
- (36) BERGMANN, U.; TUUTTILA, A.; MORGUNOVA, E. and TRYGGVASON, K. Crystal Structure of Human Mmp-2. (*to be published*).
- (37) DHANARAJ, V.; WILLIAMS, M. G.; YE, Q.; MOLINA, F.; JOHNSON, L. L.; ORTWINE, D. F.; PAVLOVSKY, A.; RUBIN, J. R.; SKEEAN, R. W.; WHITE, A. D.; HUMBLET, C.; HUPE, D. J. and BLUNDELL, T. L. (1999): X-ray Structure of Gelatinase A Catalytic

- Domain Complexed with a Hydroxamate Inhibitor. *Croatica Chemica Acta* 72: 575-591.
- (38) MORGUNOVA, E.; TUUTILA, A.; BERGMANN, U. and TRYGGVASON, K. (2002): Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 7414-7419.

————— *Artículo original* —————

Farmacología de Terpenoides de *Helianthus annuus* L.

Recibido el 23 de abril de 2007

RODRIGO EUGENIO DÍAZ VICIEDO *

Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

RESUMEN

Desde los albores de la humanidad, las plantas han sido fuente de interés por sus características nutricionales y medicinales. Por ello, se realizó un estudio farmacológico de terpenoides de *Helianthus annuus* L., optimizando un método de extracción, aislamiento y purificación de dichos metabolitos, para evaluar una posible actividad farmacológica sobre modelos de inflamación. También se evaluó una potencial actividad antiinflamatoria utilizando extractos (metanólico y acuoso) de la planta. Se aislaron tres diterpenos, dos kauranos y un traquilobano, mediante técnicas cromatográficas, identificándose sus estructuras por RMN (^1H , ^{13}C) y eva-

* Contacto:

Rodrigo Eugenio Díaz Viciedo.

Avenida Gran Bretaña 1093, Playa Ancha, Valparaíso, Chile.

Teléfono: 32-2508440.

Fax: 32-2508111.

E-mail: rodrigo.diaz@uv.cl

Abreviaturas: ϕ : Diámetro; λ : Longitud de onda; CC: Cromatografía en Columna; COX: Ciclooxigenasa; DMSO: Dimetilsulfóxido; EIA: Enzimoimmunoensayo; ELISA: Enzime-Linked Inmunosorbent Assay; FLA₂: Fosfolipasa A₂; h: Altura; HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución; IFN- γ : Interferón gamma; LPS: Lipopolisacárido bacteriano; LTB₄: Leucotrieno B₄; MPO: Mieloperoxidasa; MTT: Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; NO: Oxido nítrico; NP/PEG: Reactivo Productos Naturales/Poli-etilenglicol; PBS: Tampón fosfato; PGE₂: Prostaglandina E₂; RMN: Resonancia magnética nuclear; TLC: Cromatografía en capa fina; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; TPA: 13-Acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.

luando su pureza por HPLC. Paralelamente se evaluó la variación estacional del ácido grandiflorólico y de la mezcla de ácido kaurenoico y traquilobánico obtenida, en diferentes sumidades de la planta durante su desarrollo, con el fin de determinar dónde y cuándo se produce una máxima acumulación del metabolito estudiado, para así obtener una extracción con un mayor rendimiento. Se encontraron diferencias significativas útiles para el control de calidad de preparados a base de plantas medicinales que contengan algunos de estos metabolitos secundarios. Para el estudio de la actividad farmacológica de los terpenoides y de los extractos, se trabajó sobre dos modelos de inflamación (*in vivo* e *in vitro*). En el modelo *in vivo* se evaluó la acción de los compuestos sobre el edema producido por aplicación tópica de TPA en oreja de ratón, evaluando en paralelo la infiltración leucocitaria en términos de actividad mieloperoxidasa. En este modelo los ácidos kaurenoico y traquilobánico demostraron actividad antiinflamatoria. En el modelo *in vitro* se utilizaron cultivos celulares de una línea de macrófagos, evaluando la actividad de los compuestos sobre la liberación de mediadores inflamatorios (NO, PGE₂ y TNF- α), y sobre la enzima COX, donde se observó que el ácido grandiflorólico y el extracto metanólico mostraron actividad inhibitoria sobre la liberación de estos mediadores, además el ácido grandiflorólico mostró actividad inhibitoria de la enzima COX. Sin embargo, no se descarta que en las actividades antiinflamatorias de dichos compuestos estén implicados otros mediadores.

Palabras clave: Productos naturales.—Terpenos.—Macrófagos.—Inflamación.

ABSTRACT

Pharmacology of Terpenoids from *Helianthus annuus* L.

Since the dawn of the humanity plants have been a source of interest because of their nutritional and medicinal characteristics. For that reason, a pharmacologic study of the terpenoids of *Helianthus annuus* L. was done, optimizing a method of extraction, isolation and purification of these metabolites in order to evaluate a possible pharmacologic activity in inflammation models. Also, potential antiinflammatory activity was evaluated using extracts (methanolic and watery) of the plant. Three diterpenes, two kauranes and a trachylobane were isolated, by means of chromatographic techniques; their structures were identified by RMN (¹H, ¹³C) and their purity was evaluated by HPLC. Parallely, the seasonal variation of grandiflorolic acid and kaurenoic and the trachylobanic acid mixture obtained was evaluated, in different above-ground parts from the plant during its development, with the purpose of determining where and when the highest accumulation of the studied metabolite occurs thus to obtain an extraction with the greatest yield. Useful significant differences were found for the quality control of preparations with medicinal plants that contain some of these secondary metabolites. For the study of the pharmacologic activity of the terpenoids and the extracts, two models of inflammation (*in vivo* and *in vitro*) were worked on. In the *in vivo* model, the action of compounds was evaluated on edema produced by

topical application of TPA in mouse ear, evaluating in parallel the leucocitary infiltration in terms of mieloperoxidase activity.

In this model the kaurenoic and trachylobanic acids demonstrated antiinflammatory activity. In the *in vitro* model cellular cultures of a line of macrophages were used, the activity of compounds on the liberation of inflammatory mediators (NO, PGE₂ and TNF- α), and the COX enzyme were evaluated, where it was observed that the grandiflorolic acid and the methanolic extract showed inhibiting activity on the liberation of these mediators. Also, the grandiflorolic acid showed inhibiting activity on the COX enzyme. However, one does not rule out other mediators being implicated in the antiinflammatory activities of these said compounds.

Key words: Natural products.—Terpenes.—Macrophages.—Inflammation.

INTRODUCCIÓN

Ricas en nutrientes, las plantas constituyen una de las principales fuentes de alimento y energía. Desde sus orígenes, el hombre las consume y las cultiva, siendo hoy en día indispensables para su supervivencia. Sin embargo, el ser humano mediante su observación empírica, no solamente aprendió a consumirlas, sino también a utilizarlas para curar sus heridas y sus dolencias. Este hecho, quizá, sería el preámbulo de lo que mucho más tarde, ya en el año 1815, Seydler definiría como Farmacognosia.

La Farmacognosia es la Ciencia Farmacológica que se ocupa del conocimiento de las materias primas de origen biológico que el farmacéutico o la industria farmacéutica emplean para la elaboración de los medicamentos. En los últimos años esta definición ha ido adquiriendo un resurgimiento y una relevancia muy importante dentro del contexto farmacéutico y social. Es clara la tendencia mundial de crecimiento de este mercado, donde las personas se están volcando hacia «lo natural», en el cual no sólo participan los productos fabricados a partir de drogas vegetales y plantas medicinales, sino también los productos homeopáticos.

En este contexto, es imprescindible y fundamental que el crecimiento y desarrollo de los productos naturales venga acompañado y validado por medio de la investigación científica.

Podemos decir que los productos naturales han desempeñado, y desempeñan un papel significativo en la medicina moderna porque nos proporcionan un número elevado de fármacos extremadamente útiles, difíciles en algunos casos de sintetizarlos en el laboratorio. También sirven como prototipos o modelos para fármacos de síntesis con actividad similar al original, más eficaces y menos tóxicos (1).

El Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid ha venido desarrollando hasta ahora diversas investigaciones vinculadas al estudio de los productos naturales, desde su extracción, aislamiento y purificación, hasta su acabado estudio farmacodinámico sobre diferentes modelos (*in vivo* e *in vitro*) y sistemas (Sistema Nervioso Central, Sistema Cardiovascular Periférico, etc.) que conduzcan a descubrir nuevos fármacos con aplicación terapéutica. Por consiguiente, este trabajo pretende seguir con estos mismos cánones, enmarcándose dentro de esta línea de investigación desarrollada hasta el momento.

Para la realización de esta investigación se eligió como sustrato vegetal el girasol (*Helianthus annuus* L.). Trabajos realizados tomando como materia prima las flores y las cabezuelas desprovistas de las semillas, dieron como resultado el aislamiento de diterpenos de tipo kaurano, como los ácidos kaurenico y traquilobánico (2). También se ha descrito la presencia de otro derivado, el ácido grandiflorólico en extractos provenientes de estas sumidades (3).

En los últimos años, se ha evaluado la actividad antiinflamatoria, tanto *in vitro* como *in vivo* de algunos compuestos diterpénicos, de estructura kaurano, como el foliol y el linearol (4) entre otros, encontrándose que estos compuestos inhiben significativamente la liberación de algunos mediadores de la inflamación. Otros diterpenos, del tipo clerodanos, abietanos y rosanos, mostraron una marcada acción sobre la vía de la ciclooxigenasa, que determina la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂). Los abietanos, por su parte, afectaron la producción de óxido nítrico (NO) (5). Otros terpenos de origen marino, como la variabilina y la bolinaquinona, mostraron una marcada inhibición sobre la fosfolipasa A₂ (FLA₂), además de inhibir la síntesis y posterior liberación del leucotrieno B₄ (LTB₄) (6-7).

Como objetivos de este trabajo se propusieron el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de estructura terpénica de

Helianthus annuus L.; la evaluación de la variación estacional de estos metabolitos en los órganos de la planta, con el fin de estudiar la distribución de estos en la especie y finalmente estudiar la actividad farmacológica de estos metabolitos y de los extractos obtenidos a partir de esta especie vegetal.

Como se dijo anteriormente, este trabajo se enmarca dentro de esta línea de investigación, y dado el contenido en compuestos diterpénicos de la especie *Helianthus annuus* L., con este estudio se pretende contribuir al conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado tanto para el estudio de la variación estacional de los metabolitos, como para el aislamiento de los mismos, fue recolectado en dos periodos de tiempo distintos (3 de septiembre de 2004 y 23 de octubre de 2004), coincidiendo con su periodo de cosecha (septiembre-noviembre). Ambos grupos de muestras se obtuvieron de un mismo lugar geográfico, en Picazo del Júcar (Cuenca), Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. Este material vegetal se desecó a temperatura ambiente para luego proceder a separar las sumidades de ambos grupos, agrupándolas en tres subgrupos: flores, cabezuelas y hojas. A continuación estos subgrupos se sometieron a molturación.

Procesos de extracción

Los extractos de los distintos subgrupos de estas sumidades aéreas se obtuvieron mediante el proceso de extracción en Soxhlet, utilizando éter de petróleo (punto de ebullición 40-65° C), hasta agotamiento del material vegetal, aproximadamente cinco días. Los extractos resultantes de cada subgrupo se concentraron por separado, mediante destilación a vacío en un rotavapor (R-Büchi), obteniéndose un residuo semisólido amarillo-rojizo con cada uno de ellos. Estos

residuos fueron conservados a una temperatura de 2 a 8° C para su posterior análisis cromatográfico: cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el posterior estudio fitoquímico y farmacológico se obtuvieron un extracto metanólico y un extracto acuoso, ambos de las hojas de *Helianthus annuus* L. mediante extracción Soxhlet.

Procesos de aislamiento y purificación

Del extracto obtenido a partir de 1 kg de cabezuelas sin semillas (44 g) se eliminan los ácidos grasos realizando una saponificación con 27,5 g de KOH, 200 mL de MeOH, 50 mL de benceno y 25 mL de agua, en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas, calentando a reflujo durante dos horas más. El residuo obtenido se diluye en agua hasta 40 mL aproximadamente. Esta solución se neutraliza y acidifica con un exceso de ácido acético glacial hasta alcanzar un $\text{pH} \approx 2$, para posteriormente realizar una extracción con éter etílico en embudo de decantación. Se elimina la fase acuosa. La fase orgánica se lava con agua, se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a sequedad en rotavapor, obteniéndose un residuo de 39,1 g. Este residuo se trató con 384 mL de MeOH y 118 g de urea durante una hora a reflujo, con el fin de eliminar como clathratos la mayoría de los componentes de cadena lineal (hidrocarburos, alcoholes y ácidos grasos) que interfieren en el proceso de aislamiento. Transcurrido el reflujo, la solución se filtra y el filtrado se evapora a sequedad para luego realizar nuevamente una extracción con éter etílico en las mismas condiciones anteriores. La fase orgánica se lava con agua, se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a sequedad en rotavapor, obteniéndose 21,4 g de un residuo. Este residuo fue cromatografiado en columna de sílica gel 60 (tamaño partícula 0,040-0,063 mm, $h_{\text{columna}} = 34$ cm, $\phi_{\text{columna}} = 6,5$ cm), eluyendo por gradiente fracciones de 200 mL aproximadamente. Se utilizaron los siguientes eluyentes en las proporciones indicadas: hexano, hexano: acetato de etilo 9:1, hexano: acetato de etilo 3:1 y hexano: acetato de etilo 1:1.

Cromatografía en columna con gel de sílice impregnado con AgNO₃

Esta técnica es muy utilizada para separar isómeros moleculares que eluyen juntos por cromatografía ordinaria, y que sólo se diferencian entre sí por el número de insaturaciones presentes en su estructura química. Tanto el ión Ag⁺ como la plata en su estado metálico (Ag⁰) poseen cierta afinidad por los enlaces insaturados en una molécula. La magnitud de la afinidad es proporcional al número de insaturaciones. La metodología fue la misma que se utilizó en la cromatografía en columna, pero en este caso se utiliza sílica gel impregnada con nitrato de plata (AgNO₃). Para este ensayo se utilizó sílica gel 60 con 10% de AgNO₃ (700 g de sílica gel + 70 g de AgNO₃ + 70 mL agua) ($h_{\text{columna}} = 26 \text{ cm}$, $\phi_{\text{columna}} = 6 \text{ cm}$). Como eluyente se utilizó una mezcla de hexano: acetato de etilo 88:12, en elución isocrática, eluyendo fracciones de 100 mL aproximadamente.

Identificación estructural de los compuestos obtenidos

Se llevó a cabo mediante técnicas de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un espectrómetro Avance Bruker de 250 MHz, utilizando CDCl₃ como solvente y tetrametilsilano como patrón de referencia. Se realizaron espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT-125 y HSQC con el fin de identificar la naturaleza estructural de los carbonos.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Esta técnica fue aplicada tanto a los extractos obtenidos como a los productos eluidos en las cromatografías en columnas, que permite visualizar de forma preliminar la composición de dichos extractos y la pureza de los compuestos eluidos, respectivamente. Estas cromatografías se realizaron sobre cromatofolios con soporte de aluminio de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) con indicador de fluorescencia al UV, utilizando como fases móviles una mezcla de hexano: acetato de etilo 1:1 (para los extractos etéreos), tolueno: cloroformo: etanol 40:40:10 (para el extracto metanólico y los productos eluidos en CC)

y acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua 100:11:11:26 (para los extractos metanólico y acuoso). Como reactivo de revelado se utilizaron la vainillina sulfúrica —solución A: vainillina al 1% en etanol (10 mL), solución B: H₂SO₄ al 5% en etanol (5 mL)— y el NP/PEG (Natural Products Poliethilenglycol reagent) (solución A: ácido β-etilamino éster difenilbórico al 1% en metanol (10 mL), solución B: PEG-4000 al 5% en etanol (8 mL), emisión de fluorescencia a una λ de 365 nm).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Esta técnica se utilizó para cuantificar los metabolitos aislados de la CC en los extractos obtenidos para poder establecer e investigar la variación estacional de los mismos. Además, esta técnica nos facilitó información sobre la composición y la pureza de los extractos y de los metabolitos aislados, respectivamente, estudio que se llevó a cabo por HPLC en fase reversa. Antes de proceder a su inyección, los extractos se prepararon siguiendo una modificación del protocolo descrito por Kubo (8). Una cantidad conocida (10-30 mg) del extracto etéreo obtenido se disolvió en metanol (3 mL), esta solución se pasó a través de una pequeña columna (diámetro interno 0,5 mm) compactada con Silicagel 0,040-0,063 mm (Merck) (0,5 cm), carbón (Merck) (0,2 cm) y Silicagel (0,5 cm), respectivamente. Una vez realizada esta operación, se procedió a lavar esta columna con metanol (2 mL), sumando este volumen a los 3 mL anteriormente obtenidos. Esta solución metanólica fue la que se inyectó en el equipo de HPLC. Como patrón externo (curva estándar) se utilizó una solución madre de 10 mg/mL de los productos obtenidos en la CC. Se utilizó un cromatógrafo modular, modelo Varian Mos. 2510, equipado con detector UV *diode array* y con una columna Tracer Excel 120 ODS B 5 μm, 25 × 0,46. Como fase móvil se utilizó metanol HPLC en elución isocrática con un flujo de 1 mL/min a 40° C.

Edema inducido por TPA en oreja de ratón

Se siguió la técnica descrita previamente por Recio y cols. (9). El proceso inflamatorio se inició mediante la aplicación de 10 μL del

éster de forbol TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) (Sigma) (2,5 µg/oreja) disuelto en acetona, en cada superficie (interna y externa) de la oreja derecha de todos los ratones Swiss machos (25 ± 3 g), agrupados en lotes de seis animales. Simultáneamente, se aplicó en la misma oreja el producto de referencia (indometacina) (0,25, 0,5 y 1,0 mg/oreja) o el compuesto problema (0,25, 0,5 y 1,0 mg/oreja), utilizando como vehículo acetona. Se aplicó el mismo volumen del vehículo (acetona) en la oreja izquierda (control). A las cuatro horas se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical para obtener a continuación, mediante un sacabocados, secciones de 6 mm de diámetro de la porción central de las orejas. El edema producido en cada ratón se midió mediante la diferencia de peso entre la oreja tratada y la oreja control. Estas muestras fueron utilizadas a continuación para la determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa.

Determinación de la actividad mieloperoxidasa

La actividad de esta enzima, contenida en los lisosomas de neutrófilos, es un indicador de la presencia de estos leucocitos en los exudados inflamatorios, por lo que su determinación a partir de las secciones de oreja obtenidas en el ensayo anterior, indica el grado de infiltración de neutrófilos que ha tenido lugar durante el desarrollo del ensayo. Después de homogenizar las secciones de las orejas (40 segundos) en 1,5 mL de suero fisiológico, se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4° C. La actividad mieloperoxidasa se midió en los sobrenadantes según el método descrito por Gil y cols. (10). La reacción se realizó en placas de 96 pocillos, y para ello se añadió a 50 µL de sobrenadante, 150 µL de tampón fosfato PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM), 15 µL de NaH₂PO₄ (0,22 M, pH 5,4), 20 µL de H₂O₂ (0,034%) y 20 µL de tetrametilbencidina (Sigma) (18 mM en dimetilformamida al 8%). Después de una incubación de tres minutos a 37° C, se detuvo la reacción con 30 µL de tampón acetato sódico (1,46 M, pH 3,0) midiéndose las absorbancias (densidades ópticas) a 630 nm en un lector de placas (Digiscan mod. 6010152EU, Asys Hitech). Los resultados se expresan como absorbancias a esta longitud de onda, del lote control y de los diferentes lotes problema.

Materiales de cultivo celular

El cultivo de la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7 utilizados para los siguientes experimentos se realizó en un incubador a 37° C en atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO₂ en placas Petri estériles de 10 mL (Sarstedt). El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (Cf = 2 mM), suero bovino fetal (Cf = 10%), penicilina-estreptomocina (Cf = 2%), gentamicina (Cf = 0,4%) y L-arginina (Cf = 1 mM). Todos los productos señalados anteriormente son de Gibco, con excepción de la L-arginina (Sigma).

Estudio de la toxicidad celular

Una vez obtenidos los macrófagos mediante rascado de una placa Petri y posterior centrifugación (800 g, 5 min, t^a ambiente), se realizó el recuento de los mismos y se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/mL. Se distribuyeron alícuotas de 200 µL en placas estériles de 96 pocillos (Sarstedt), y se incubaron durante dos horas para permitir su adherencia al fondo de la placa, tras lo cual se reemplazó el medio con el fin de eliminar las células no adheridas. Las células se trataron con los compuestos objeto de estudio a distintas concentraciones (concentración final de DMSO < 0,001%) durante un periodo de incubación de 24 horas. A continuación, se determinó la viabilidad de estas células, para estudiar el posible efecto tóxico del compuesto, mediante la cuantificación de la respiración mitocondrial a través de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) a formazán, siguiendo el método descrito por Scudiero (11). Para ello, se sustrajeron 100 µL del medio de cultivo de cada pocillo, adicionando a continuación 20 µL de MTT estéril (2 mg/mL en tampón PBS). Tras incubar una hora a 37° C se eliminó el medio y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo, para solubilizar los cristales de formazán formados. La formación de formazán se determinó espectrofotométricamente a 550 nm en un lector de placas (Digiscan mod. 6010152EU, Asys Hitech). Los resultados se expresan como % de viabilidad respecto a las células sin tratar, que representan el 100% de viabilidad (12).

Generación de óxido nítrico (NO)

Se prepararon los macrófagos en las mismas condiciones que el ensayo anterior, distribuyéndose alícuotas de 200 μL ($0,5 \times 10^6$ células/mL) en placas estériles de 96 pocillos. Después de incubar durante 24 horas se reemplazó el medio con el fin de eliminar las células no adheridas y se añadieron los compuestos problema, incubando las células durante 30 minutos. A continuación se procedió a estimular a los macrófagos, añadiendo una mezcla del lipopolisacárido LPS [*Salmonella typhimurium* (Sigma), 0,5 $\mu\text{g/mL}$] e IFN- γ [murino, (Genzyme), 20 U/mL], continuando la incubación durante 17-20 horas. La concentración de NO liberado al medio se midió determinando la presencia de nitritos con el reactivo de Griess (13). Se prepararon alícuotas de 100 μL de los medios de cultivo en placas de 96 pocillos, a las que se añadieron 100 μL de reactivo de Griess [1% de sulfanilamida (Sigma), 5% de H_3PO_4 y 0,1% de N-[1-naftil]etilendiamina (Sigma) en agua destilada]. La absorbancia del cromóforo resultante se midió en un espectrofotómetro de placas a 540 nm. Las concentraciones de nitritos en las muestras se calcularon mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar de NaNO_2 .

Generación de TNF- α

Se procedió al cultivo de los macrófagos de la misma manera anterior, pero en este caso se utilizaron placas de 24 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Siguiendo el mismo procedimiento ya descrito para el pretratamiento con el compuesto problema y la estimulación con LPS/IFN- γ , se procedió a la determinación de los niveles del TNF- α en los sobrenadantes, basado en una fase sólida ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) siguiendo las instrucciones y recomendaciones indicadas por el proveedor (Amersham Biosciences). Como inhibidor de referencia se utilizó dexametasona (1 μM).

Generación de PGE₂

Se cultivaron macrófagos de la misma manera anterior, en placas de 24 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Después de incubar por un periodo de 18 horas aproximadamente, se procedió a reponer el medio de cultivo, se pretrató con los compuestos en estudio y finalmente se estimuló con LPS/IFN- γ . Después de 16 horas de incubación, se recogen los sobrenadantes y se procede a medir los niveles de PGE₂ utilizando para ello el kit comercial Prostaglandin E₂ Bio-trak Enzymeimmunoassay (EIA) System, siguiendo las instrucciones y recomendaciones indicadas por el proveedor (Amersham Biosciences). Cabe destacar que los niveles totales de PGE₂ cuantificados en este experimento son el producto de la actividad conjunta de la COX-1 y de la COX-2.

Ciclooxigenasa-1 (COX-1)

Los macrófagos (10^6 células/mL) fueron sonicados a 4° C en un ultrasonicador a máxima potencia. Los microsomas fueron preparados por centrifugación (2.000 g, 5 min., 4° C), seguido de una ultracentrifugación del sobrenadante (100.000 g, 100 min., 4° C) (6). Los microsomas obtenidos (20 μ g/tubo) se preincubaban durante 15 minutos en 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,4, con hematina (2 μ M), L-triptófano (1 mM) y con los compuestos problema. Transcurrido este tiempo, se adiciona ácido araquidónico (100 μ M) y se incuba a 37° C durante 30 minutos. La reacción se detiene por calentamiento a 90° C durante cinco minutos. Los niveles de PGE₂ fueron determinados por EIA.

Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

Los macrófagos (10^6 células/mL) fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 con aspirina (300 μ M) e incubados a 37° C durante dos horas. Se realizó un lavado dos veces, para luego resuspenderlas en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino e incubadas con LPS/IFN- γ a 37° C durante 24 horas. Después de una centrifugación (800 g, 5 min., 4° C) las células fueron sonicadas a

4° C en un ultrasonificador a máxima potencia, y los microsomas fueron preparados como se describió anteriormente. Los microsomas (40 µg/tubo) fueron usados como fuente de COX-2, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente (6). Los niveles de PGE₂ fueron determinados por EIA.

RESULTADOS

El extracto obtenido de las cabezuelas sin semillas de *H. annuus* L. con éter de petróleo fue sujeto a los procesos de extracción, aislamiento, purificación y caracterización anteriormente descritos, obteniéndose los siguientes derivados terpenoides, ácido traquilobánico (ácido *ent*-traquiloban-19-oico) (**1**), ácido kaurenoico (ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico) (**2a**) y ácido grandiflorólico (ácido *ent*-15β-hidroxi-kaur-16-en-19-oico) (**2b**) (Figura 1), todos ellos con una alta pureza.

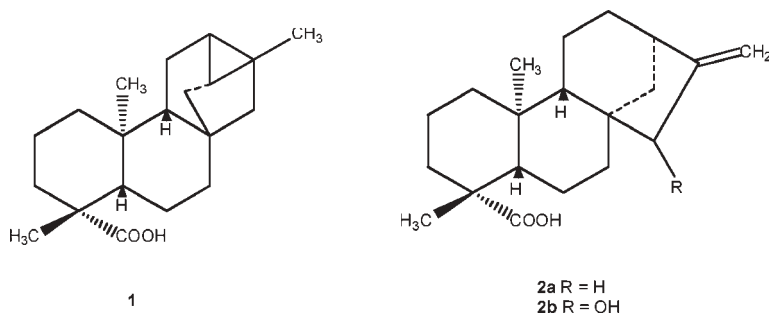


FIGURA 1. **Estructuras de los diterpenos:** ácido traquilobánico (ácido *ent*-traquiloban-19-oico) (**1**), ácido kaurenoico (ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico) (**2a**) y ácido grandiflorólico (ácido *ent*-15β-hidroxi-kaur-16-en-19-oico) (**2b**).

Considerando una potencial acción farmacológica del ácido grandiflorólico y de la mezcla de ácidos kaurenoico y traquilobánico (mezcla k/t), en una proporción 2:1, obtenida preliminarmente, se procedió a evaluar la variación estacional de ambos productos en las sumidades de la especie vegetal (Figuras 2, 3 y 4). Tanto en las hojas como en las flores de esta especie, los niveles de ácido grandifloró-

lico aumentaron significativamente aproximadamente tres veces en el otoño. Por otro lado se observó una disminución de este metabolito aproximadamente a la mitad en las cabezuelas sin semillas durante la misma estación. Cabe destacar que las mayores concentraciones de este terpeno se observaron en las cabezuelas sin semillas recolectadas en verano y en las hojas recolectadas en otoño. Paralelamente, se observó en las flores que los niveles de la mezcla k/t aumentaron al doble en el otoño, equiparándose a los niveles de ácido grandiflorólico durante el mismo periodo. En las hojas, sin embargo, se observó una disminución a la mitad de esta mezcla de metabolitos durante la estación otoñal. La mayor concentración de la mezcla k/t fue cuantificada en las cabezuelas sin semillas recolectadas durante la estación estival.

La Figura 5 resume los resultados obtenidos para el ensayo *in vivo* de los compuestos en estudio sobre el edema inducido por TPA en oreja de ratón. Cabe destacar que la administración tópica tanto de ácido kaurenico, ácido traquilobánico y de la mezcla k/t redujeron de forma significativa en un 50 % aproximadamente el edema producido por el TPA a la concentración de 1 mg/oreja.

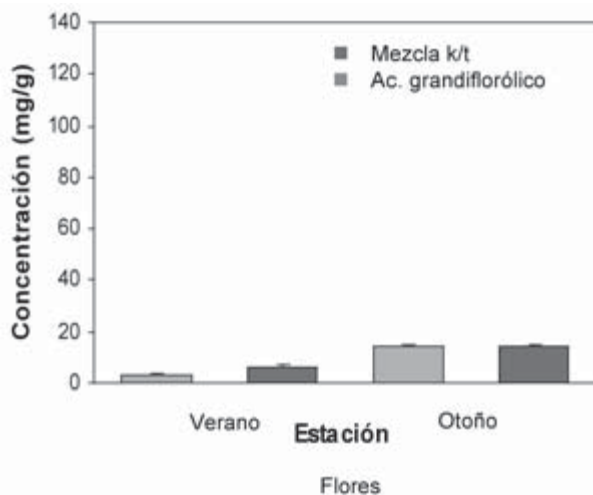


FIGURA 2. Variación estacional del ácido grandiflorólico y de la mezcla k/t en flores de *H. annuus L.*

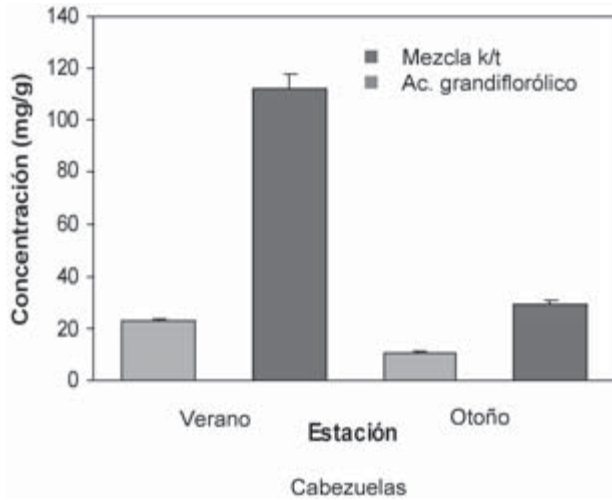


FIGURA 3. Variación estacional del ácido grandifloróico y de la mezcla k/t en cabezuelas sin semillas de *H. annuus L.*

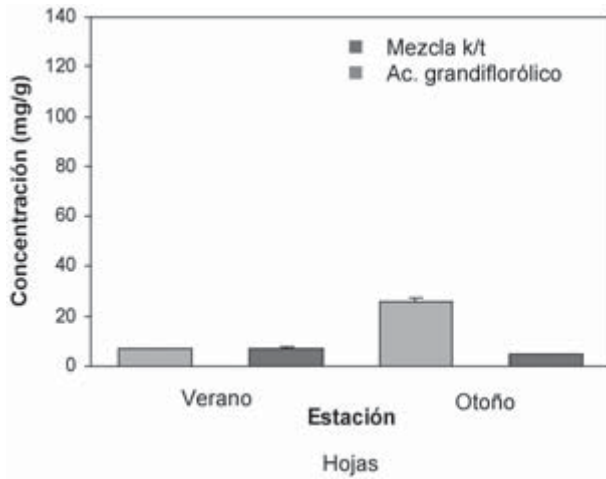


FIGURA 4. Variación estacional del ácido grandifloróico y de la mezcla k/t en hojas de *H. annuus L.*

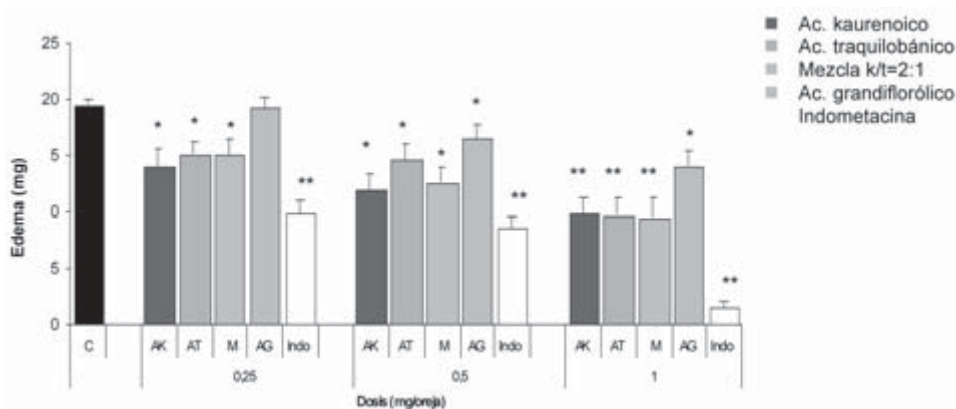


FIGURA 5. *Efecto de los terpenos ensayados en el edema inducido por TPA en oreja de ratón. Datos expresados como media ± E.S. *p < 0,05, **p < 0,01 respecto al grupo control.*

Por otro lado, para el ensayo de infiltración leucocitaria, expresada en términos de actividad de la enzima mieloperoxidasa, el ácido kaurenoico redujo significativamente la actividad de esta enzima, disminuyendo significativamente la infiltración de estas células durante el desarrollo del proceso inflamatorio (Figura 6).

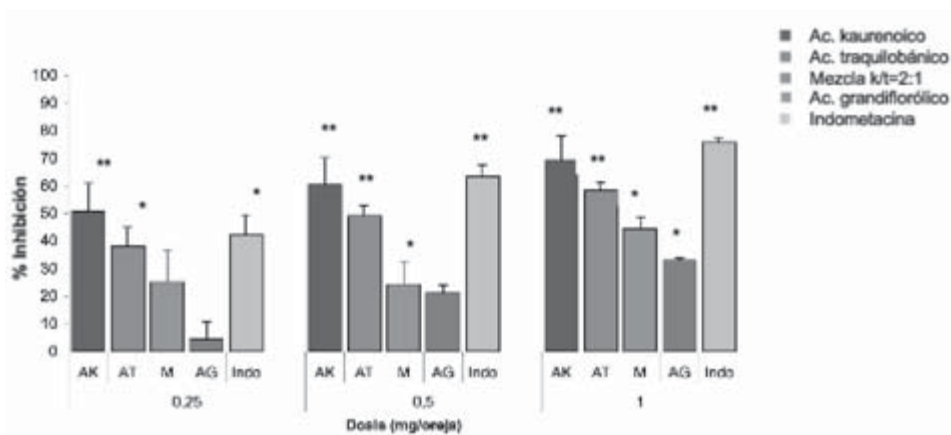


FIGURA 6. *Efecto de los terpenos estudiados sobre la actividad mieloperoxidasa. Datos expresados como media ± E.S. * p < 0,05, ** p < 0,01 respecto al grupo control.*

Antes de proceder a la evaluación farmacológica *in vitro* de un compuesto, se debe estudiar la posible toxicidad celular del mismo. Los estudios de citotoxicidad se realizaron mediante el ensayo de MTT sobre una línea celular de macrófagos (Figuras 7 y 8).

Se investigó la posible actividad, tanto de los terpenos aislados como de los extractos, sobre la generación de NO, mediador implicado en el proceso inflamatorio. Las Figuras 9 y 10 resumen los resultados obtenidos para el ácido grandiflorólico y para el extracto metanólico, respectivamente. Ambos compuestos inhibieron significativamente la liberación de este mediador. Por otro lado, el ácido grandiflorólico mostró una ligera inhibición sobre la liberación de TNF- α a las dosis ensayadas.

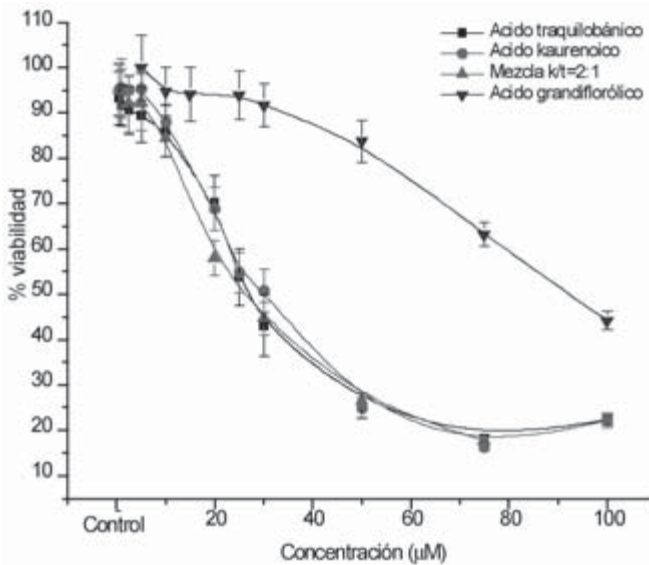


FIGURA 7. Efecto de los terpenos estudiados sobre la viabilidad celular en macrófagos.

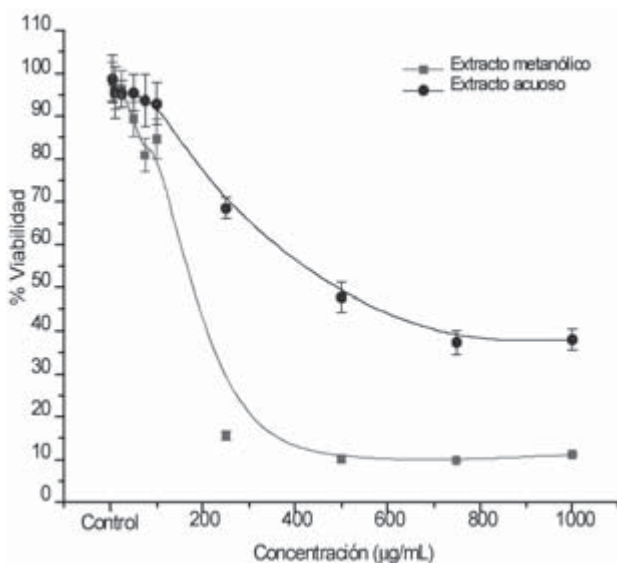


FIGURA 8. *Efecto de los extractos estudiados sobre la viabilidad celular en macrófagos.*

Los tres terpenos y la mezcla mostraron una inhibición significativa sobre la liberación de PGE_2 a las máximas concentraciones estudiadas. No obstante, el extracto metanólico inhibió significativamente la liberación de este mediador en todo el rango de concentraciones estudiadas. En base a estos resultados, al cuantificar el efecto de los compuestos estudiados sobre la actividad Ciclooxygenasa, se pretende demostrar si la inhibición de la PGE_2 observada, corresponde a la acción directa de los compuestos en estudio sobre las enzimas COX-1 y/o COX-2 semipurificadas. Tanto para el ácido traquilobánico como para el ácido kaurenoico, se observó una ligera inhibición de la actividad de ambas enzimas, reflejada en la liberación de PGE_2 . Ambos metabolitos inhiben en forma proporcional la actividad de ambas enzimas. Por otro lado, se observó que el ácido grandiflorólico presenta una mayor afinidad hacia la isoforma inducible que hacia la constitutiva, observándose una mayor inhibición de PGE_2 liberada por la activación de la COX-2. El extracto metanólico inhibió significativamente la liberación de PGE_2 mediada por la actividad de ambas isoformas enzimáticas. Como fármacos de referencia se utilizaron indometacina ($10 \mu M$) y nimesulida ($10 \mu M$).

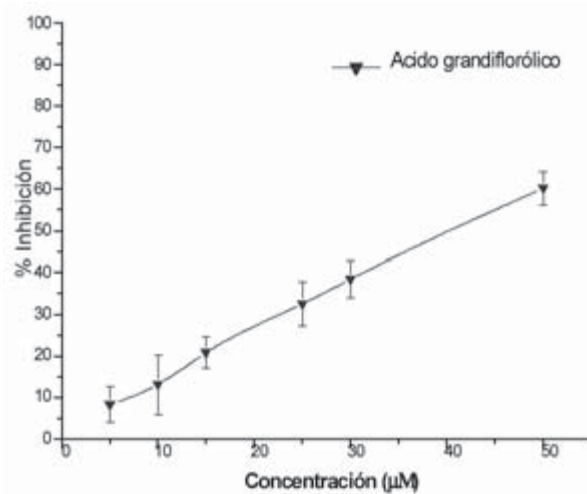


FIGURA 9. Efecto del ácido grandiflorólico sobre la generación de NO.

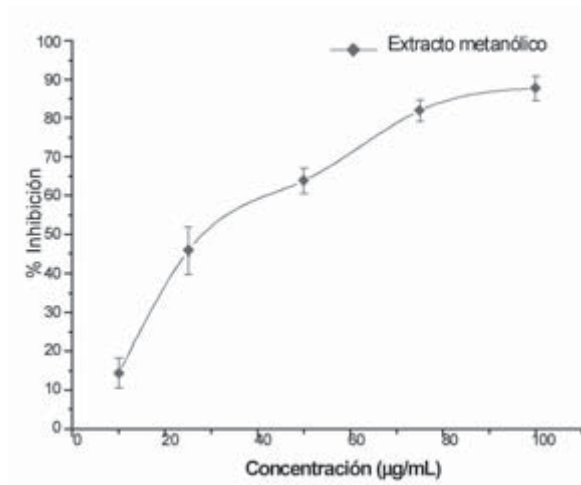


FIGURA 10. Efecto del extracto metanólico sobre la generación de NO.

DISCUSIÓN

La importancia actual de *Helianthus annuus* L., conocida como girasol, es de tipo económico, puesto que sus semillas son la materia prima para la obtención de aceite de uso culinario.

Los estudios científicos referidos a esta especie están mayoritariamente dirigidos a la genética y a la biotecnología. El girasol ha sido manipulado genéticamente con el fin de variar el contenido de un determinado ácido graso, mejorando su calidad y, al mismo tiempo, con fines benéficos para la salud humana. Los girasoles genéticamente modificados son más resistentes frente a plagas y a enfermedades propias de la planta (14), también se han desarrollado semillas híbridas de girasol de diferentes tamaños para hacer frente a algunos depredadores (15). En la actualidad se ha llegado a introducir genes de girasol que codifican para aminoácidos ricos en azufre, como metionina y cisteína, para incrementar el valor nutritivo de algunas leguminosas pobres en estos aminoácidos (16). Estudios anteriores, evaluaron la actividad antimicrobiana tanto del ácido kaurenico como del traquilobánico sobre cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, etc.) y sobre cepas fúngicas (*Candida albicans*) (17), encontrándose que ambos ácidos poseían equivalente potencia contra la cepa bacteriana. Por otro lado, sus ésteres metílicos presentaban una baja actividad sobre esta misma cepa. No se encontraron indicios de actividad antifúngica. Tomando como base esta información, se eligió trabajar con los ácidos libres y no con sus ésteres metílicos. También se estudió la acción de estos diterpenos sobre el crecimiento larvario de algunos lepidópteros, causantes de plagas que afectan el cultivo de esta especie vegetal (18), encontrándose que, tanto el ácido kaurenico como el traquilobánico inhibían significativamente el desarrollo de estas plagas. Lo anterior condujo al estudio científico de esta especie vegetal.

La inflamación es un proceso fisiopatológico complejo, mediado por una variedad de señales celulares producidas por leucocitos, macrófagos, mastocitos, plaquetas y linfocitos, así como por la activación de factores del complemento, conduciendo a la formación de edema como resultado de la extravasación de fluido y proteínas, y a la acumulación de leucocitos en el foco inflamatorio (19, 20). Los macrófagos, por su parte, juegan un papel muy importante durante el desarrollo del proceso inflamatorio, puesto que, una vez activados por citoquinas proinflamatorias o componentes bacteriales como el LPS, promueven la síntesis y liberación de mediadores químicos de la inflamación, como NO, eicosanoides y citoquinas (TNF- α) (21, 22).

Por todo lo expuesto en este trabajo de investigación, se ha iniciado el estudio farmacológico, tanto del ácido grandiflorólico como del extracto metanólico de hojas de *Helianthus annuus* L., como posibles agentes antiinflamatorios.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al Instituto de Química Orgánica General «Manuel Lora-Tamayo», perteneciente al CSIC, y al programa MECESUP UVA 0207 del Ministerio de Educación de la República de Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) VILLAR, A. M.; BERMEJO, P. y CARRETERO, M. E. (1999): Farmacognosia, conceptos generales. En: Villar del Fresno, A. M., editor. *Farmacognosia General*. Madrid: Editorial Síntesis, p. 19.
- (2) PYREK, J. S. (1970): New pentacyclic diterpene acid trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron*. 26: 5029-5032.
- (3) MARTÍN PANIZO, F. y RODRÍGUEZ, B. (1979): Diterpene compounds of the sunflower (*Helianthus annuus* L.). *An. Quim.* 75: 428-430.
- (4) DE LAS HERAS, B.; RODRÍGUEZ, B.; BOSCA, L. y VILLAR, A. M. (2003): Terpenoids: Sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Curr. Med. Chem.* 3: 171-185.
- (5) DE LAS HERAS, B.; ABAD, M. J.; SILVÁN, A. M.; PASCUAL, R.; BERMEJO, P.; RODRÍGUEZ, B. y VILLAR, A. M. (2001): Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sci.* 70: 269-278.
- (6) ESCRIG, V.; UBEDA, A.; FERRANDIZ, M. L.; DARIAS, J.; SÁNCHEZ, J. M.; ALCARAZ, M. J. y PAYÁ, M. (1997): Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 123-131.
- (7) LUCAS, R.; GIANNINI, C.; D'AURIA, M. V. y PAYÁ, M. (2003): Modulatory effect of bolinaquinone, a marine sesquiterpenoid, on acute and chronic inflammatory processes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 1172-1180.
- (8) KUBO, I.; GANJIAN, I. y KUBOTA, T. (1982): Chemotaxonomic significance of ent-kaurene diterpenes in *Rabdosia umbrosus* varieties. *Phytochemistry* 21: 81-83.
- (9) RECIO, M. D.; GINER, R. M., MANEZ, S. y RÍOS, J. L. (1994): Structural considerations on the iridoids as antiinflammatory agents. *Planta Med.* 60: 232-234.

- (10) GIL, B.; SANZ, M. J.; TERENCIO, M. C., DEGIULIO, A.; DEROSA, S.; ALCARAZ, M. J. y PAYA, M. (1995): Effects of marine 2-Polyprenyl-1, 4-hydroquinones on phospholipase A₂ activity and some inflammatory responses. *Eur. J. Pharmacol.* 285: 281-288.
- (11) SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D. y BOYD, M. R. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-33.
- (12) HATTORI, Y. y NAKANISHI, N. (1995): Effects of cyclosporine-A and Fk506 on nitric-oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cell. Immunol.* 165: 7-11.
- (13) GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. y TANNENBAUM, S. R. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [N-15]-labeled nitrate in biological-fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- (14) BURKE, J. M. y RIESEBERG, L. H. (2003): Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.
- (15) ALEXANDER, H. M.; CUMMINGS, C. L.; KAHN, L. y SNOW, A. A. (2001): Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *Am. J. Bot.* 88: 623-627.
- (16) MOLVIG, L., TABE, L. M., EGGUM, B. O., MOORE, A. E., CRAIG, S., SPENCER, D., and HIGGINS, T. J. (1997): «Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 8393-8398.
- (17) MITSCHER, L. A.; RAO, G. S. R.; VEYSOGLU, T.; DRAKE, S. y HAAS, T. (1983): Isolation and identification of trachyloban-19-oic and (-)-Kaur-16-en-19-oic acids as anti-microbial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus* L. *J. Nat. Prod.* 46: 745-746.
- (18) ELLIGER, C. A.; ZINKEL, D. F.; CHAN B. G. y WAISS JR., A. C. (1976): Diterpene acids as larval growth inhibitors. *Experientia.* 32: 1364-1366.
- (19) COUSSENS, L. M. y WERB, Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-867.
- (20) NATHAN, C. (2002): Points of control in inflammation. *Nature.* 420: 846-852.
- (21) LASKIN, D. L. y PENDINO, K. J. (1995): Macrophages and inflammatory mediators in tissue-injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 655-677.
- (22) MACMICKING, J.; XIE, Q. W. y NATHAN, C. (1997): Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.

————— *Artículo original* —————

**Vicente Cervantes Mendo: lugar y fecha
de nacimiento, bicentenario no conmemorado
y próximo 250 aniversario**

Recibido el 15 de junio de 2007

JOSÉ PASTOR VILLEGAS*

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica.

Universidad de Extremadura

RESUMEN

Vicente Cervantes Mendo, conocido hasta ahora como Vicente Cervantes, fue un insigne farmacéutico, botánico y químico. Las actividades académicas y profesionales de este científico hispanomexicano, desarrolladas durante la *Real Expedición Botánica a Nueva España (1787-1803)* y después de esta expedición científica hasta su muerte en México independiente, son mejor conocidas que su vida. En este estudio se aporta por primera vez su partida de bautismo, en la que consta que nació en Ledrada el 17 de febrero de 1758, localidad salmantina perteneciente al obispado extremeño de Plasencia (Cáceres). Así pues, la localidad de nacimiento no es Zafra (Badajoz), y el año de su nacimiento es 1758 y no 1755. La Real Academia de Farmacia de Madrid y la Sociedad Española de Historia de la Farmacia desistieron de conmemorar el bicentenario del nacimiento de Vicente Cervantes en 1955, por no conocerse exactamente dónde y cuándo nació. España y México pueden conmemorar con seguridad los 250 años del nacimiento en el año 2008.

Palabras clave: Farmacia.—Botánica.—Química.—España.—Nueva España.

* Información de contacto: José Pastor Villegas.

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica. Facultad de Formación del Profesorado.

Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n. 10071 Cáceres, España.

Teléfono: +34 927257050. Fax: +34 927257051.

jpastor@unex.es

ABSTRACT

Vicente Cervantes Mendo: locality and birth date, bicentenary does not commemorated and next 250 anniversary

Vicente Cervantes Mendo, known as Vicente Cervantes, was a famous pharmacist, botanist and chemist. This Spanish scientific developed in Mexico both significant academic and professional activities during the *Real Expedición Botánica a Nueva España (1787-1803)*; he continued such activities in Mexico until his death. His work is better known than his personal life. In his baptismal certificate appears he was born in Ledrada (Salamanca) the 17 of February of 1758. This locality belongs to the bishopric of Plasencia (Cáceres). Thus, the locality of birth of Vicente Cervantes Mendo is known for the first time, which is Ledrada (Salamanca) and not Zafra (Badajoz), as well as his birth date was in 1758 and not in 1755. By 1955, both the Real Academia de Farmacia of Madrid and the Sociedad Española de Historia de la Farmacia desisted to commemorate the bicentenary of the birth of Vicente Cervantes because his baptismal certificate was not found. Spain and Mexico may surely commemorate the 250 years of the birth in 2008.

Key words: Pharmacy.—Botany.—Chemistry.—Spain.—New Spain.

INTRODUCCIÓN

Numerosas expediciones ilustradas se realizaron durante los reinados de Carlos III y Carlos IV (1-3). Una de ellas fue la *Real Expedición Botánica a Nueva España (1787-1803)*, expedición científica compleja en la que imbricándose la Botánica y la Farmacia fue llevada a cabo desde unas perspectivas mercantilistas impregnadas de interés farmacológico (4, 5).

El mérito de Vicente Cervantes como componente de la expedición científica mexicana fue conocido y reconocido pronto en Madrid. En 1794, el Real Colegio de Boticarios de Madrid y la Regia Academia Médica Matritense le otorgaron las distinciones de Colegial Honorario y Socio Correspondiente, respectivamente (6). En el mismo año, Hipólito Ruiz López y José Antonio Pavón Jiménez, farmacéuticos y botánicos componentes de la *Real Expedición Botánica a Perú y Chile (1777-1788)*, escriben con elogio de Vicente Cervantes y le dedicaron el género de plantas *Cervantesia* R. y Pav. (7, 8).

Sin embargo, hasta 1864 no se le tributó a su memoria un recuerdo digno de su importancia (9). Un siglo después se revisó su legado

intelectual en el Primer Coloquio Mexicano de Historia de la Ciencia; Enrique Beltrán (10) destacó que durante la vida colonial fue un evento de importancia científica el arribo de la expedición botánica en 1787, que estableció el Real Jardín Botánico de México y dejó en la Nueva España al sabio Vicente Cervantes, primer catedrático de Botánica en México, a quien considera que puede encabezar el grupo de botánicos mexicanos que florecieron en el siglo XIX. Hubo publicación española conmemorativa de la expedición botánica mexicana en 1987 (11).

Vicente Cervantes figura en dos conocidos diccionarios históricos (12, 13) como farmacéutico y botánico. Según Patricia Aceves Pastrana (14), fue también un químico destacado, aspecto que compartimos (6, 15); son muy acertadas las palabras de esta investigadora al señalar el mérito de ser el primer traductor al español de la famosa obra *Traité élémentaire de Chimie*, de Antoine Laurent Lavoisier, traducción que se publicó en México para uso del Real Seminario de Minería, y de entregar su vida a la educación de la juventud mexicana. Francisco Javier Puerto Sarmiento (16) destaca también la traducción de mencionado tratado químico para facilitar la modernidad química y unir las dos importantes ciencias útiles Botánica y Química. Las autoras de una publicación reciente (17) han analizado la actividades de Vicente Cervantes en la botica novohispana del Hospital General de San Andrés entre 1791 y 1808; concluyen que hizo rentable la botica y que ejerció la docencia aportando conocimientos de Farmacia, Botánica y Química para superar el modelo gremial de aprendizaje e iniciar el reconocimiento institucional de la profesión farmacéutica.

Los datos biográficos proporcionados por José García Ramos (9), algunos erróneos y otros imprecisos, pasaron a las publicaciones posteriores hasta el presente. Recientemente, he hallado documentos que permiten precisar la biografía de Vicente Cervantes Mendo, conocido como Vicente Cervantes. En el presente estudio se trata del lugar y fecha de nacimiento de este científico vinculado con Extremadura, aportando su partida de bautismo. Se trata también del bicentenario de su nacimiento, proyectado y no conmemorado, y se propone a las comunidades científicas española y mexicana la posibilidad de conmemorar el 250 aniversario del nacimiento de este español y mexicano en el año 2008.

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO DE VICENTE CERVANTES EN PUBLICACIONES ANTERIORES A 1955

Datos biobibliográficos de Vicente Cervantes figuran en tres obras de carácter colectivo del siglo XIX (7, 18, 19). En la primera (7) no se da lugar ni fecha de nacimiento. En la segunda (18) se afirma sólo ser natural del obispado de Plasencia en Extremadura. En la tercera (19) se afirma ser natural de Plasencia y que murió en México el 26 de julio de 1829.

Como se ha mencionado anteriormente, hasta 1864 no fue realidad una publicación monográfica sobre Vicente Cervantes (9); José García Ramos, individuo de número del Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid y Ayudante Profesor de la Real Botica, la escribió por encargo de mencionada corporación profesional, leyéndola en la sesión de aniversario celebrada el 21 de agosto de 1864. En el acta de esta sesión consta un voto de gracias por tan digno trabajo (6). La publicación figura en el Museo de la Real Academia Nacional de Farmacia (20) y fue reimpresa por el Instituto de Biología de México en 1869 (21). La Figura 1 muestra el ejemplar que se conserva en la Real Academia Nacional de Medicina, en el que se puede leer la dedicatoria a Quintín Chiarlone, presidente de la sesión conmemorativa.

José García Ramos manifestó el interés del Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid de elogiar al científico que nos ocupa y la dificultad para hacerlo con estas palabras (9):

«Tiempo hacía que el Colegio deseaba con ansia tributar a su memoria un recuerdo digno de su importancia, señalando su elogio histórico como tema de un discurso de aniversario; pero por grandes que fuesen sus deseos y su intención loable, faltaban medios de llevarlo a cabo, por la dificultad que presentaba a su realización el tener que rebuscar en Archivos y Bibliotecas los datos necesarios, si por ventura se conservan; dificultad que dejaría de ser tan grave, si las obligaciones que la práctica de la profesión impone a los colegiales no fuesen tan personales y penosas».

Con la información de un pariente, el autor del elogio histórico escribió que Vicente Cervantes nació en Zafra (Badajoz) en el año 1755. Así consta (9):

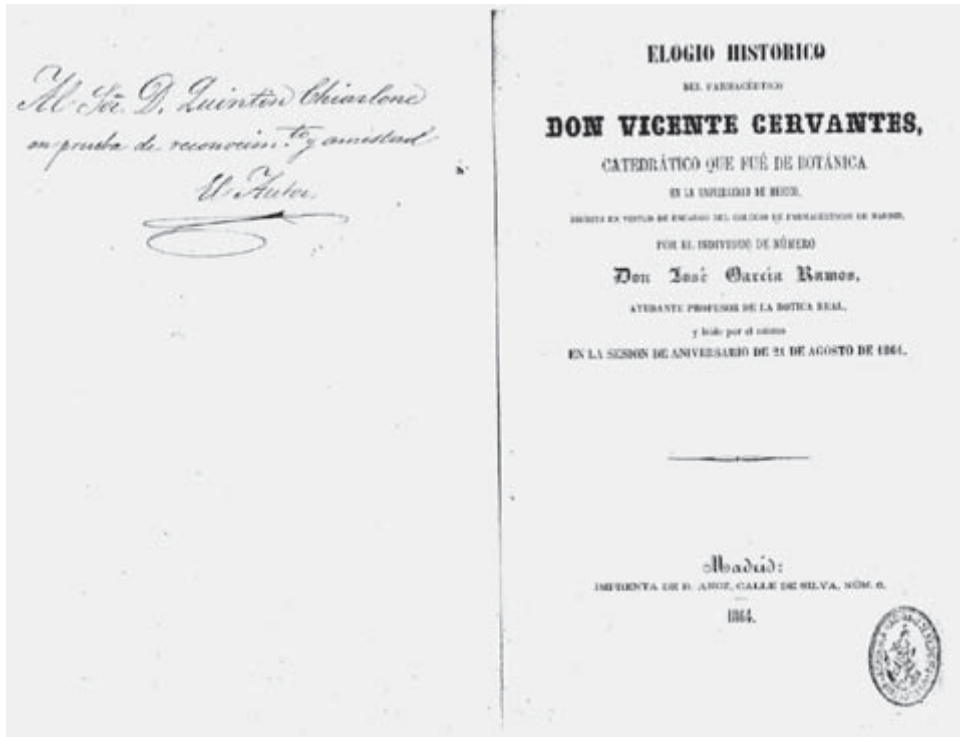


FIGURA 1. *Elogio histórico de Vicente Cervantes por José García Ramos.*

«Por otra parte, un dignísimo pariente de Cervantes, que tuvo la fortuna de vivir en su compañía por espacio de algunos años (en nota a pie de página consta que un exceso de modestia de dicho señor nos priva de consignar su nombre en este sitio), ha tenido la amabilidad de facilitar cuantos datos biográficos se le han pedido, con la espontaneidad y el gozo de aquel que paga deudas sagradas de gratitud y contribuye al lustre de su familia, que es al propio tiempo la gloria propia.

Don Vicente Cervantes nació en Zafra, villa de la provincia de Badajoz en el año 1755. Sus padres, de modesta posición, pero de honrados procederes [...]».

El lugar y fecha de nacimiento dados por José García Ramos pasaron primero al libro *Historia de la Farmacia*, de los conocidos

autores Quintín Chiarlone y Carlos Mallaina (22), y después a publicaciones diversas, como son las tres (23-25) que se comentan brevemente.

Silvio Ibarra Cabrera escribió un folleto de divulgación científica en 1936 que fue reimpresso al año siguiente (23); toma información de José García Ramos y expresa la dificultad al escribirlo con estas palabras:

«Tarea, y no fácil, es bosquejar la vida de un individuo del que tenemos datos tan exiguos, al grado de ignorar la fecha de su nacimiento, quiénes fueron sus padres, quién su mujer, además de no haber llegado hasta nosotros siquiera un retrato que nos diera vaga idea de su fisonomía; pero no obstante todo esto, y ya que por dicha conocemos su obra, que es lo esencial, siendo oportuno el momento y digno el objeto, intentamos esbozar, aun cuando sea a trazos burdos y rápidos, la vigorosa personalidad de un hombre que tuvo actuación tan destacada en el terreno científico en las postrimerías de nuestro México Colonial: el Profesor Don Vicente Cervantes».

Harold William Rickett (24) hizo un estudio de la expedición botánica a Nueva España basado en documentación del Archivo General de la Nación (México); toma el lugar y fecha de nacimiento dados por José García Ramos, y hace constar a pie de página los datos de Nicolás León (19). Los datos del autor del elogio histórico pasaron también a la tercera (25), que es un estudio de los naturalistas de la América Latina.

BICENTENARIO DEL NACIMIENTO DE VICENTE CERVANTES NO CONMEMORADO EN 1955 Y PUBLICACIONES POSTERIORES

En los primeros años de la década de 1950 se publicaron cuatro artículos sobre la expedición botánica mexicana (26-29). Enrique Álvarez López (28) redescubrió el mérito de Vicente Cervantes como botánico. Éstas fueron sus palabras:

«Pero especial realce ha de darse, en justicia, a la labor de Vicente Cervantes, cuya gran pericia y profundos conocimientos botánicos le acreditan como uno de los más insignes componentes de la ex-

pedición y cuya labor no se limitó, como de hecho se le asigna de ordinario y con ser lo asignado muy importante, a la enseñanza de la ciencia de las plantas en la capital mejicana, a la dirección del Jardín Botánico de aquella ciudad durante las largas ausencias de Sessé y a la remisión de algunos especímenes a Cavanilles y a otros botánicos. Como digo, no tenía yo duda de que la labor de aquel sabio profesor no se había limitado al campo docente, sino que su actividad como investigador había de haber sido mucho más extensa de lo que ordinariamente se cree, especialmente durante los primeros tiempos de la expedición, cuando algunos de sus colegas no tenían acaso todo el saber y la preparación que luego alcanzaron, perteneciéndole con pleno derecho ser considerado como uno de los miembros más salientes de la misma. El afortunado hallazgo de los documentos estudiados a continuación permite hoy convertir tal presunción en certeza».

En mi opinión, tales artículos propiciaron la búsqueda de la partida de bautismo de Vicente Cervantes en los años anteriores a 1955. La Real Academia de Farmacia de Madrid y la Sociedad Española de Historia de la Farmacia, aceptando la idea de Gustavo López García, proyectaron rendirle un homenaje en la efemérides del bicentenario de su nacimiento, asunto que consta en varias actas de sesiones.

La aceptación de la idea brindada consta en el acta de la reunión de la Comisión de Régimen Interior de la Real Academia de Farmacia del día 23 de diciembre de 1952 (30):

«Se ha recibido una carta a [de] D. Gustavo López García, de Zafra, brindando a la Academia la idea de celebrar el segundo centenario del nacimiento de Vicente Cervantes, en Zafra en mil setecientos cincuenta y cinco.

Se consultan antecedentes y se acuerda escribir a dicho señor, aceptando en principio la idea y recomendándole se ponga en contacto con el Delegado de la Academia en Badajoz, señor Remón Camacho [Doctor Don Juan Remón Camacho], para pensar lo que puede hacerse».

La Sociedad Española de Historia de la Farmacia trató también del bicentenario del nacimiento de Vicente Cervantes en la reunión celebrada el día 20 de febrero de 1953 (31):

«El Doctor Roldán lee una carta de Don Gustavo López García, en la que adjunta unas cuartillas, dando cuenta del resultado de sus infructuosos trabajos para encontrar datos exactos sobre el nacimiento del ilustre farmacéutico botánico Don Vicente Cervantes, fundador de la Escuela y Jardín Botánico de México y que, según todos los historiadores, nació en Zafra. Comunica el Señor López García que ha revisado los libros-registro de bautismo de 1755 en la parroquia de Zafra, sin encontrar vestigio alguno. Se acuerda publicar las cuartillas del Señor López García en el Boletín de la Sociedad, y por los asistentes se proponen diversas gestiones para localizar datos más concretos sobre la fecha de nacimiento de don Vicente Cervantes».

En las tres reuniones siguientes de mencionada sociedad histórica se volvió a tratar del asunto. El 25 de marzo de 1953 (31), se discute la conveniencia de investigar más en documentaciones de México y Zafra. El 22 de abril de 1953 (31) se da cuenta de las investigaciones infructuosas en el Archivo de la Diputación de Madrid y se solicitan datos a Plasencia. El 27 de mayo de 1953 (32) se dio lectura a una carta del Párroco de Zafra, en la que comunicaba que no se encontraba dato alguno sobre la partida bautismal.

En un primer artículo de Gustavo López García (33), muy poco conocido, se preguntó dónde y cuándo nació Vicente Cervantes al aproximarse la efemérides del bicentenario del nacimiento, extrañándole que en Zafra (Badajoz) no se le conociera como segedano ni siquiera por las personas más cultas de la ciudad:

«Hablé de este injusto olvido a varias de las contadas personas con quien me relaciono, algunas eruditas, y ninguna tenía la menor noticia de esta gloria segedana. Cambié impresiones sobre el asunto con nuestro culto compañero, mi dilecto amigo, de esta ciudad, Doctor Álvarez Prieto, y éste recordó que, hace algunos años, su discípulo y amigo el Doctor Zúñiga, celoso Secretario perpetuo de la Real Academia de Farmacia, le encargó que averiguase en el archivo parroquial la fecha precisa del nacimiento de Vicente Cervantes, nacido, según los datos que se conservan en la citada alta Corporación farmacéutica, en la ciudad de Zafra en el año 1755, y que revisado por el Párroco el tomo correspondiente de las inscripciones de bautismo, no había encontrado en éste ningún bautizado que llevara el apellido Cervantes.

Me pareció muy extraño todo esto. No podía dudar de la seriedad y honradez de los historiadores que señalan como lugar natal de Vicente Cervantes la ciudad de Zafra, y como fecha de su nacimiento el año 1755 [...].

Dejé la cuestión en pie, en espera de poder hacer personalmente una investigación concienzuda en el archivo parroquial, y al aproximarse la fecha del bicentenario del nacimiento del ilustre hijo de Zafra, se me ocurrió que sería oportuno aprovechar la efemérides para sacarle a la luz ante sus olvidadizos paisanos y promover con tal motivo un homenaje a su memoria más o menos brillante, según las aportaciones que consiguiera.

Pero, antes de interesar al Excmo. Ayuntamiento de esta ciudad en el asunto, consideré conveniente consultar con mis buenos amigos los doctores Roldán y Zúñiga, quienes aplaudieron calurosamente mi propósito y me ofrecieron interesarse para que la Sociedad Española de Historia de la Farmacia y la Real Academia le patrocinaran. Y me pareció absolutamente necesario precisar la fecha del nacimiento, a la vez que comprobar que Vicente Cervantes había nacido en esta ciudad».

El resultado negativo de las investigaciones emprendidas hizo que Gustavo López García se plantease las preguntas que siguen, invitando ampliamente a dar respuestas (33):

«El resultado negativo obtenido en la búsqueda de la partida de bautismo de Vicente Cervantes plantea una serie de cuestiones que voy a presentar en forma de preguntas, invitando a dar sobre ellas su opinión a la docta Sociedad Española de Historia de la Farmacia, a cuantos se ocupan de investigaciones históricas de asuntos farmacéuticos y significativamente a la suprema autoridad del maestro de todos, Doctor Folch y Andreu.

¿En qué documentos se basa la afirmación de que Vicente Cervantes nació en Zafra en el año 1755?

¿Son estos documentos bastante fehacientes para suplir la falta de la correspondiente partida de bautismo?

¿Pudo nacer Vicente Cervantes en Zafra y no ser bautizado por no pertenecer sus padres a la comunión católica?

¿Puede ser uno de los siete “Hijos de la Iglesia” que cambiara su apellido putativo por el de Cervantes?

¿Pudo nacer en una de las poblaciones menores que rodean a Zafra y que, aunque con Ayuntamiento independiente, dependan en cierto modo de esta ciudad, y atribuirse él mismo la oriundez de la capital de la comarca?

¿Hay error en el nombre de la ciudad natal o en el año del nacimiento de Vicente Cervantes?»

No fue posible la conmemoración del bicentenario del nacimiento del insigne boticario, botánico y químico, por no hallarse la partida de bautismo buscada. Gustavo López García, intentando contestar a sus propias preguntas, escribió, con el mejor de los deseos, una fantasía sobre el nacimiento de Vicente Cervantes y los primeros años de vida (34), que no se ajusta a los datos de su vida que se aportan en la sección siguiente.

Con posterioridad a 1955, se ha mantenido como lugar de nacimiento Zafra, y como fecha 1755 en diccionarios (12, 13), publicaciones sobre la expedición botánica mexicana (10, 11, 35-37) y en otras publicaciones que incluyen datos biográficos de Vicente Cervantes.

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO DE VICENTE CERVANTES MENDO Y POSIBILIDAD DE CONMEMORAR EL 250 ANIVERSARIO DE SU NACIMIENTO EN 2008

Al final del año 2003 tomamos (6), con dudas, el lugar y año de nacimiento que señala José García Ramos (9). Por fin, en los primeros días de 2006, hallé la partida de bautismo de Vicente Cervantes en el Archivo de la Parroquia de San Miguel Arcángel de Ledrada (38). En ella consta que **Vicente Cervantes Mendo nació en Ledrada, el 17 de febrero de 1758, hijo legítimo de José Cervantes y Águeda Mendo Pérez**, siendo bautizado a los ocho días de su nacimiento. En la Figura 2 se muestra una fotografía del folio que contiene la partida de bautismo hallada, cuyo texto con ortografía actual sigue a continuación:

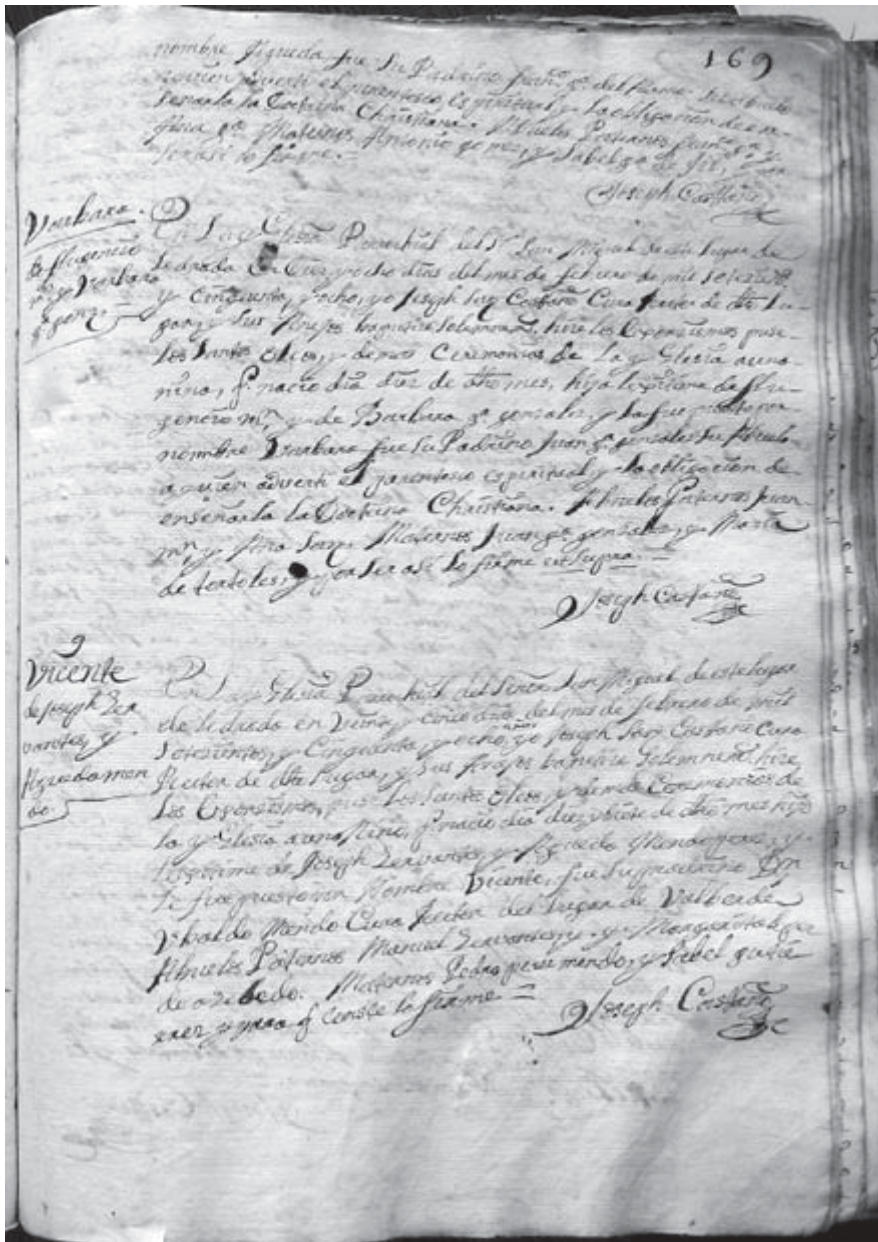


FIGURA 2. Fotografía del Folio 169 del Libro 3 del Archivo de la Parroquia de San Miguel Arcángel de Ladrada que contiene la partida de bautismo de Vicente Cervantes Mendo.

«En la Iglesia Parroquial del Señor San Miguel de este lugar de Ladrada en veinte y cinco días del mes de febrero de mil setecientos y cincuenta y ocho, yo José San Castaño cura Rector de dicho lugar, y sus Anejos, bauticé solemnemente, hice los exorcismos, puse los Santos Óleos, y demás ceremonias de la Iglesia a un niño, que nació el día 17 de dicho mes, hijo legítimo de José Cervantes y Águeda Mendo Pérez, y le fue puesto por nombre Vicente. Fue su padrino D. Ubaldo Mendo, Cura Rector del lugar de Valverde. Abuelos paternos Manuel Cervantes y Margarita López de Azebedo, y abuelos maternos Pedro Pérez Mendo e Isabel Gutiérrez. Y para que conste lo firma

José Castaño»

En el margen izquierdo del folio consta:

«Vicente, de José Cervantes y Águeda Mendo».

Por consiguiente, Vicente Cervantes es en realidad Vicente Cervantes Mendo; la localidad de nacimiento es Ladrada (Salamanca), perteneciente al obispado extremeño de Plasencia (Cáceres), y no Zafra (Badajoz), y el año de su nacimiento es 1758 y no 1755. Estos datos demuestran que José García Ramos recibió información biográfica errónea al escribir el elogio histórico. Los datos aportados son definitivos para modificar lo que se ha escrito hasta ahora sobre el lugar y fecha de nacimiento del científico que nos ocupa.

En los últimos veinte años, además de la conmemoración del bicentenario de la expedición botánica mexicana (11), dos hechos académicos conexos con la vida de Vicente Cervantes se pueden destacar. En sesión académica de la Real Academia de Farmacia, María del Carmen Francés Causapé expuso el estado de la Farmacia durante el reinado de Carlos III, dando cuenta de las reformas notables introducidas en este ramo de la sanidad y de su repercusión social (39). Patricia Aceves Pastrana (40), en el discurso de ingreso pronunciado en su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, abordó los procesos de profesionalización e institucionalización de la Química y la Farmacia ocurridos en la Nueva España a finales del siglo XVIII; destacó las aportaciones de los españoles peninsulares y novohispa-

nos, en particular de Vicente Cervantes. Aportada la partida bautismal de este insigne científico en el presente estudio, es posible que España y México puedan conmemorar con seguridad el 250 aniversario de su nacimiento en 2008, por sus reconocidos méritos de investigación, docencia y gestión desde su llegada a México colonial en 1787 hasta su muerte en México independiente en 1829.

CONCLUSIONES

De lo expuesto anteriormente, se deducen las conclusiones siguientes:

1. Vicente Cervantes Mendo, conocido hasta ahora como Vicente Cervantes, nació en Ledrada (Salamanca), el 17 de febrero de 1758, localidad perteneciente al obispado extremeño de Plasencia (Cáceres). Así pues, no nació en Zafra (Badajoz) en 1755.

2. La Real Academia de Farmacia de Madrid y la Sociedad Española de Historia de la Farmacia desistieron (acertadamente) de conmemorar el bicentenario del nacimiento de este insigne farmacéutico, botánico y químico en 1955, por no conocerse exactamente dónde y cuándo nació. Con los datos aportados en el presente estudio, España y México pueden conmemorar con seguridad los 250 años del nacimiento de este hispanomexicano en el año 2008, quien desarrolló actividades académicas y profesionales significativas durante la *Real Expedición Botánica a Nueva España (1787-1803)*, continuándolas después de esta expedición científica hasta su muerte en México independiente.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de los archivos y bibliotecas que he consultado. A los ingenieros J. F. Pastor Valle y A. Hoya Vicente, por su ayuda informática.

REFERENCIAS

- (1) CALATAYUD ARINERO, M. A. (1984): *Catálogo de las expediciones y viajes científicos españoles a América y Filipinas (siglos XVIII y XIX)*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.
- (2) GUIRAO DE VIERNA, A. (1989): Análisis cuantitativo de las expediciones españolas con destino al Nuevo Mundo, en *Ciencia, vida y espacio iberoamericano* (Peset, J. L., coord.), vol. 3, 65-93. CSIC. Madrid.
- (3) PUIG-SAMPER, M. A. (1991): Las expediciones científicas durante el siglo XVIII, en *Historia de la Ciencia y de la Técnica* (Puerto Sarmiento, F. J., dir.) núm. 28. Akal. Madrid.
- (4) PUERTO SARMIENTO, F. J. (1988): *La ilusión quebrada. Botánica, sanidad y política científica en la España Ilustrada*. Serbal/CSIC. Barcelona.
- (5) PUERTO SARMIENTO, F. J. (1991): El papel de la Farmacia española en el proyecto colonial ilustrado. *OFFARM* 10: 66-70.
- (6) PASTOR VILLEGAS, J. y PASTOR VALLE, J. F. (2003): *Páginas extremeñas sobre el caucho*. La Coria. Fundación Xavier de Salas. Trujillo.
- (7) COLMEIRO, M. (1858): *La Botánica y los botánicos de la Península hispano-lusitana: estudios bibliográficos y biográficos*, 184. M. Rivadeneyra. Madrid.
- (8) CLEMENT, J. P. (1987): De los nombres de las plantas. *Revista de Indias*, 47: 501-531.
- (9) GARCÍA RAMOS J. (1864): *Elogio histórico del farmacéutico Don Vicente Cervantes, catedrático que fue de Botánica en la Universidad de México*. Imprenta R. Anoz. Madrid.
- (10) BELTRÁN, E. (1964): La Biología mexicana en el siglo XIX, en *Memorias del Primer Congreso Mexicano de Historia de la Ciencia* (Beltrán, E., ed.), vol. 1: 271-297. México, D. F.
- (11) SÁNCHEZ, B.; PUIG-SAMPER, M. A. y SOTA, J. DE LA (eds.) (1987): *La Real Expedición Botánica a Nueva España, 1787-1803*. Comisión Quinto Centenario/Real Jardín Botánico/CSIC. Madrid.
- (12) ROLDÁN GUERRERO, R. (1958-1976): *Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*, vol. 1, 659-661. Gráficas Valera. Madrid.
- (13) LÓPEZ PIÑERO, J. M. (1983): Vicente Cervantes, en López Piñero, J. M.; Glick, T. F.; Navarro Brotóns, V. y Portela Ramos, M., *Diccionario histórico de la ciencia moderna en España*, vol. 1, 209-210. Ediciones Península. Barcelona.
- (14) ACEBES PASTRANA, P. (1993): *Química, Botánica y Farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
- (15) PASTOR VILLEGAS, J. (2006): Extremeños en la iniciación de la enseñanza de la Química en España y Nueva España: Pedro Gutiérrez Bueno, Juan Pablo Forner y Vicente Cervantes, en *Libro de Resúmenes del Octavo Congreso de Estudios Extremeños* (Hermoso Ruiz, F., ed.), 59. Badajoz.
- (16) PUERTO SARMIENTO, F. J. (2003): Retratos. Vicente Cervantes (1755-1829). El español mejicano. *Consejos de tu farmacéutico*, núm 39: 28.

- (17) MORALES COSME, A. y ACEBES PASTRANA, P. (2003): Negocio, reglamentación y profesionalización farmacéutica: la botica del Hospital General de San Andrés (1770-1809). *Montalbán* 36: 45-64.
- (18) BERISTAIN DE SOUZA, J. M. (1883): *Biblioteca hispano-americana septentrional o catálogo y noticias de los literatos que o nacidos o educados, o florecientes en la América septentrional española, han dado luz algún libro*, vol. 1, 103-105. Ediciones Fuente Cultural. México.
- (19) LEÓN, N. (1895): *Biblioteca botánico-mexicana. Catálogo bibliográfico, biográfico y crítico de autores y escritos referentes a vegetales de México y sus aplicaciones, desde la conquista hasta el presente*. Suplemento a la Materia Médica Mexicana publicada por el Instituto Médico Nacional, 85-88. Oficina Tip. de la Secretaría de Fomento. México.
- (20) ALIAGA GARCÍA, M. J. (2001): *La Biblioteca de la Real Academia de Farmacia de Madrid desde sus orígenes hasta 1946*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- (21) GARCÍA RAMOS, J. (1869): Elogio histórico. *Bol. Soc. Mex. Geog. Est.*, segunda época, 1.
- (22) CHIARLONE, Q. y MALLAINA, C. (1865): *Historia de la Farmacia*, 487-491. Imprenta de José M. Ducazcal. Madrid.
- (23) IBARRA CABRERA, S. (1937): Profesor Don Vicente Cervantes. *Anales del Instituto de Biología* (México) 8: 631-647.
- (24) RICKETT, H. W. (1947): The Royal Botanical Expedition to New Spain 1788-1820. *Chronica botanica* 11: 1-86.
- (25) CHARDON, C. E. (1949): *Los naturalistas de la América Latina*, vol. 1, 111-113. Secretaría de Estado de Agricultura, Pecuaria y Colonización. Ciudad Trujillo, República Dominicana.
- (26) BARRAS Y ARAGÓN, F. DE (1950): Notas para una historia de la expedición botánica de Nueva España. *Anuario de Estudios Americanos* 7: 411-469.
- (27) GUTIÉRREZ COLOMER, L. (1950): Historia del Real Jardín Botánico de México. *Bol. Soc. Esp. Hist. Farmacia*, núm. 3: 65-76.
- (28) ÁLVAREZ LÓPEZ, E. (1951): Noticias y papeles de la expedición científica mejicana, dirigida por Sessé. *Anales del Instituto Botánico A. J. Cabanilles* 10: 1-79.
- (29) SOMOLINOS D'ARDOIS, G. (1954): Tras la huella de Francisco Hernández: la ciencia novohispana del siglo XVIII. *Historia mexicana*, 4: 174-197.
- (30) ARCHIVO DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Libro de Actas de la Comisión de Régimen Interior del día 23 de diciembre de 1952. Madrid.
- (31) ACTAS NÚMEROS 31, 32 y 33 DE LAS SESIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA DE LA FARMACIA celebradas los días 20 de febrero, 25 de marzo y 22 de abril de 1953. *Bol. Soc. Esp. Hist. Farmacia*, núm. 14: 87-89.
- (32) ACTA NÚMERO 34 DE LA SESIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA DE LA FARMACIA, celebrada el día 27 de mayo de 1953. *Bol. Soc. Esp. Hist. Farmacia*, núm. 15: 132-133.
- (33) LÓPEZ Y GARCÍA, G. (1953): ¿Dónde y cuándo nació Vicente Cervantes? *Bol. Soc. Esp. Hist. Farmacia*, núm. 13: 33-55.

- (34) LÓPEZ GARCÍA, G. (1957): Una fantasía sobre el nacimiento y los primeros años de Vicente Cervantes. *Bol. Soc. Esp. Hist. Farmacia*, núm. 29: 24-29.
- (35) ARIAS DIVITO, J. C. (1968): *Las expediciones científicas españolas durante el siglo XVIII. Expedición Botánica de Nueva España*. Cultura Hispánica. Madrid.
- (36) Engstrand, I. H. W. (1981): *Spanish Scientists in the New World: The Eighteenth-Century Expeditions*. University of Washington. Washington.
- (37) LOZOYA, X. (1984): *Plantas y luces en México. La Real Expedición Científica a Nueva España (1787-1803)*. Serval/CSIC. Barcelona.
- (38) ARCHIVO DE LA PARROQUIA DE SAN MIGUEL ARCÁNGEL DE LEDRADA, Libro 3, Folio 169. Ledrada (Salamanca).
- (39) FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C. (1989): La Farmacia durante el reinado de Carlos III. *An. Real Acad. Farm.* 55: 74-92.
- (40) PATRICIA ACEVES, P. (2004): La renovación de la Farmacia en la Nueva España a finales del periodo colonial. *An. Real Acad. Nac. Farm.* 70: 125-145.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

27 de septiembre

A las 19 horas, toma de posesión como Académico Correspondiente del Profesor Zbigniew Szybinski, con la lectura de su discurso: «Population strategy of primary prevention in iodine deficiency and new diagnosed type 2 diabetes».

4 de octubre

A las 19 horas, Mesa Redonda de la Sección 1.^a sobre Innovación Farmacéutica. Coordinador: Profesor Doctor Antonio Monge Vega: «El descubrimiento de nuevos fármacos en el 2006. Aproximaciones al descubrimiento de nuevos compuestos en el sistema nervioso central». Ponentes: Doctora María Teresa García López. Instituto de Química Médica. CSIC: «Potencial terapéutico del tripéptido N-terminal del IGF-1 y de sus miméticos como fármacos neuroprotectores», y Doctora Ana Martínez Gil. Directora I+D. Neuropharma: «Investigación y desarrollo de fármacos modificadores de la enfermedad del Alzheimer».

10 de octubre

A las 19 horas, conferencia por la Doctora Cristina M. Rondinone, Director Research Metabolic Diseases Hoffmann-La Roche Inc. sobre: «Nuevas terapias basadas en el RNA de interferencia».

11 de octubre

A las 19 horas, II Mesa Redonda sobre el Balneario de Valdeleja. Ponentes: Doctores Raimundo Jiménez Ballesta y Francisco Monturiol: «Los suelos del término municipal de Valdeleja». Doctora Esperanza Torija: «Análisis físico-químico de las aguas», y Doctora Milagros Pozuelo Cuervo: «Análisis de la radiactividad en las aguas del balneario».

Noticias

La Doctora María Cascales Angosto, Académica de Número, ha sido nombrada Doctor «Honoris Causa» por la UNED. También participó en el Congreso: «Diálogo entre las tres culturas y nuestra herencia europea» (Toledo, crisol de la Cultura y el alba del Renacimiento), celebrado del 2 al 5 de septiembre en Toledo, y organizado por la Academia Europea de la que es miembro numerario.

* * *

Del 20 al 22 de septiembre se celebró en la Facultad de Farmacia de la UCM de Madrid, la Asamblea General de la Asociación Europea de Facultades de Farmacia EAFF, donde tomó posesión de su cargo de Presidente de la misma, el Excmo. Señor Don Benito del Castillo, Académico de Número y Decano de la Facultad de Farmacia de la UCM.

* * *

La Doctora Flora de Pablo Dávila, Académica Correspondiente, ha sido nombrada por el Gobierno de España nueva directora del Instituto de Salud Carlos III. Es la primera mujer que ocupa este cargo.

* * *

El *Diario Médico* publica una información sobre el trabajo realizado por la Doctora Margarita Lorenzo Balado, Académica Correspondiente, sobre «La hiperinflamación del obeso explica la resistencia insulínica».

* * *

El Doctor Bartolomé Ribas Ozonas, Académico de Número, será uno de los dos Presidentes del XVI Encuentro Anual de la Asociación Alexander Von Humboldt de España.

* * *

El Parque Científico Tecnológico de Madrid ha organizado una serie de cursos prácticos en los próximos meses de octubre y noviembre, dirigidos por el Académico Correspondiente, Doctor Sinisterra Gago.

* * *

El 26 de septiembre fue elegida Presidenta de Honor de la Academia Internacional de Historia de la farmacia, la Excma. Señora Doña María del Carmen Francés Causapé, Académica de Número.

* * *

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 Doctor Enrique Villar, Académico Correspondiente, ha sido invitado a formar parte del panel de expertos para aconsejar al gobierno del Reino Unido en situaciones de emergencia u otras contingencias.

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