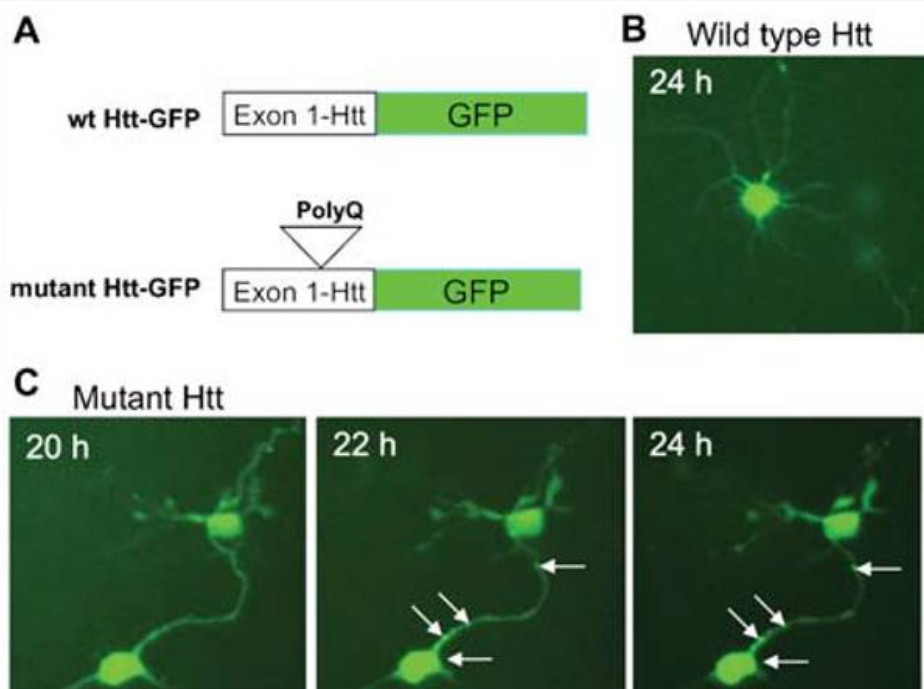




RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.
Vol. 75, n. 1 2009
ISSN 1697-4271
Publicación electrónica
trimestral



Nuevo modelo celular para el estudio de la señalización de insulina en miocardio

Yolanda F. Otero, Manuel Benito de las Heras*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 28 de junio de 2008.

RESUMEN

En los últimos años, la prevalencia de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 ha aumentado en las sociedades occidentales. Un efecto subyacente en los individuos aquejados de obesidad asociada o no a diabetes tipo 2 es la resistencia a la insulina y el daño cardiovascular, siendo éste la principal causa de muerte. Sin embargo, el impacto de la resistencia a la acción de la insulina sobre la función cardiaca es desconocido. En este trabajo, hemos estudiado la señalización de la insulina y la resistencia a la misma en cardiomiocitos neonatales de ratón. Para ello, hemos generado una nueva línea celular de cardiomiocitos inmortalizados. En dicha línea, hemos estudiado la expresión de distintas proteínas implicadas en la cascada de señalización celular de la insulina, como el receptor de insulina y sus principales sustratos IRS-1 e IRS-2, así como la vía de señalización mediada por PKB/Akt, ERKs y p70/S6K. También, se estudiaron enzimas implicadas en la regulación de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, tales como la AMPK y la Acetil-CoA Carboxilasa. Además, se estudió la captación de glucosa radiactiva bajo distintos estímulos. Los resultados obtenidos sugieren que nuestros cardiomiocitos son sensibles a la estimulación por insulina y ácidos grasos, pero resistentes en lo referido a la captación de glucosa. Dicha resistencia a la acción de la insuli-

na por ácidos grasos en cardiomiocitos podría contribuir a la intolerancia a la glucosa asociada a los estados de obesidad que cursan con diabetes tipo 2.

Palabras clave: Cardiomiocitos; Ácidos grasos; AMPK; ACC; Glucosa.

ABSTRACT

Insulin signaling study in new cellular model from myocardium

In the last years, the prevalence of obesity and metabolic diseases like diabetes type 2 and metabolic syndrome, suffered an increase. Underlying effect in people with obesity with or without diabetes type 2, are insulin resistance and cardiovascular disease that are one of the major cause of death. Nevertheless, the action of insulin resistance over cardiac function is unknown. In this work, we studied the insulin signaling and its resistance in mice neonatal cardiomyocytes. We generated a new cellular line of immortalized cardiomyocytes. In these cells we studied the expression of several proteins of insulin signaling pathway like insulin receptor and their major substrates IRS-1 and IRS-2, besides PKB/Akt pathway, ERKs and p70/S6K. We also studied some β -oxidation enzymes like Acetyl-CoA Carboxilase and AMPK. Finally, we studied glucose uptake with 2-Deoxy-glucose under different stimuli. The results showed that our new cell line are insulin and free fatty acids sensitive but it presents insulin resistance to glucose uptake which can be due to a low expression of GLUT4. In conclusion, these new cellular model may be useful to study glucose intolerance associated to obesity that appears in diabetes type 2.

Key Words: Cardiomyocytes; Fatty acids; AMPK; ACC; Glucose.

1. INTRODUCCIÓN

El corazón es un órgano único en muchos sentidos. Está formado por cardiomiocitos que son células musculares especializadas adaptadas para contraerse de forma coordinada y continua. Esto es vital para la supervivencia del organismo dado que el papel central del corazón es el mantenimiento del sistema cardiovascular, que libera oxígeno, sustratos metabólicos y hormonas al resto del cuerpo. En los últimos años ha aumentado en las sociedades occidentales, la prevalencia de la obesidad y de las enfermedades metabólicas relacionadas con ella, como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (1). Un efecto subyacente en los individuos aquejados de las patologías citadas, es la resistencia a la acción de la insulina (2) y el daño cardiovascular, siendo ésta una de las principales causas de muerte en la población con enfermedad cardiovascular. Sin embargo, poco se sabe sobre el impacto de la resistencia a la acción de la insulina en la función cardiaca.

El metabolismo cardíaco está regulado por: la disponibilidad de sustrato, hormonas (insulina), trabajo cardíaco (demanda de energía) y aporte de oxígeno. Dada la importancia de la función contráctil continua, no es sorprendente que el corazón haya sido descrito como un órgano que puede utilizar muchos sustratos diferentes para generar ATP bajo diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas (3). Como es de suponer, la diabetes tiene una marcada influencia en el metabolismo cardíaco debido a que el aporte de sustratos se encuentra alterado, la acción de la insulina se ve afectada, y existen mal adaptaciones metabólicas en el corazón diabético (4, 5).

Se han realizado muy pocos estudios sobre el impacto que causa la diabetes tipo 2 en el metabolismo cardíaco. Se supone que existe un incremento en la utilización de ácidos grasos como sustrato para la obtención de ATP y que ello podría tener consecuencias deletéreas, siendo un posible mecanismo de cardiomiopatía diabética (6).

La asimilación de glucosa por el músculo (cardiaco y esquelético) está determinada principalmente por 2 factores independientes pero interrelacionados, a saber, las concentraciones locales de insulina y la intensidad del ejercicio/contracción. Los ácidos grasos

no esterificados (NEFAs) modulan el transporte de glucosa mediado por insulina e inhiben la oxidación de glucosa en mayor medida que la asimilación de glucosa por el corazón (7). Sin embargo, la glucosa suprime la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, a través de la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa I por malonil-CoA (8, 9).

La secreción de insulina estimula la asimilación de glucosa en los miocitos por aumento de la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. Además, la insulina inhibe la liberación de NEFAs desde el tejido adiposo. Así, disminuyen las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos y por lo tanto se previene la inhibición de la glicólisis y la oxidación de piruvato mediada por NEFA (así como el efecto inhibitorio de los mismos en la señalización de insulina). La magnitud del consumo de glucosa observada con algunas concentraciones de insulina *in vivo* se verá reducida a medida que aumentan las cantidades circulantes de NEFA. Este principio de competición de sustratos entre glucosa y NEFA es tan conocido, que inicialmente los investigadores asumieron incorrectamente que la diabetes tipo 2 era secundaria a una elevación crónica de los niveles de NEFA en plasma (10). La supresión de la oxidación de glucosa por los ácidos grasos, sin embargo, es sólo un componente más de un complejo sistema de interacciones metabólicas.

En diabetes, el corazón está expuesto a un ambiente hiperinsulinémico e hiperglucémico. Inicialmente, se adapta a este ambiente incrementando la expresión de proteínas del metabolismo de ácidos grasos, de esta forma aumenta su dependencia de los ácidos grasos como combustible. Este corazón adaptado es capaz de mantener la producción cardiaca bajo estas condiciones. Sin embargo, cabría la posibilidad de que una exposición continuada a este ambiente metabólico pudiera conducir a una disfunción cardiaca. A medida que la diabetes progresa, la excesiva disponibilidad de ácidos grasos y lípidos podría exceder la tasa de uso por el corazón, produciendo una acumulación lipídica en los cardiomiocitos. La menor dependencia de los ácidos grasos como sustratos del corazón hipertrofiado en un medio diabético precipitará la deposición lipídica en los cardiomiocitos, y por lo tanto acelerará la lipotoxicidad.

Se han generado ratones con una delección específica del receptor de insulina en el corazón (CIRKO), revelando que la insulina es capaz de regular a largo plazo varios aspectos de la biología cardiaca (11).

La utilización del sustrato metabólico está alterada en los corazones de ratones CIRKO. Se produce una disminución de las tasas de oxidación de glucosa debido a la pérdida de la señalización de la insulina, también se observa que el contenido proteico de GLUT4 está aumentado, mientras el de GLUT1 está disminuido. En diabetes, la expresión de ambos transportadores de glucosa se ve reducida en el corazón (12). La reducción de GLUT4 podría reflejar los efectos indirectos de la pérdida de la señalización de insulina, mientras la regulación a la baja de GLUT1 reflejaría los efectos directos de la deficiencia de insulina en el corazón.

En este trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos: 1. Obtener nuevas líneas de cardiomiocitos neonatales de ratón que permitan el estudio de la señalización de insulina. 2. Estudiar la ruta de β -oxidación en este tipo celular y comprobar que existe una regulación de los ácidos grasos sobre la señalización de insulina. 3. Determinar si el modelo celular obtenido es válido para el estudio de la sensibilidad y/o resistencia a la insulina.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratones machos y hembras procedentes del ICAI de la UCM. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas, 8:00-20:00/20:00-8:00), temperatura (23 ± 3 °C) y humedad ($65 \pm 1\%$) durante todo el periodo experimental. Todas las manipulaciones con animales se realizaron de acuerdo con las Normativas Internacionales para el uso y manejo de animales de laboratorio aprobadas por el National Research Council (Washington, 1996), la Directiva Europea 86/609 CEE y bajo las normas previstas por el Comité Ético de la Universidad Complutense.

Se procedió al cruce de ratones machos y hembras. Después del período de gestación, se tomaron los neonatos de un día, se les extrajo el corazón y se procedió al cultivo primario, punto de partida para la generación de las nuevas líneas.

2.1. Cultivo primario

Se realizó a partir de los corazones de los neonatos en grupos de 3. Se trocearon los corazones y se introdujeron en 1 ml de una solución de PBS 1x con 1,2 mg/ml de colagenasa (Colagenasa tipo 2, Worthington) y 10 µg/ml DNAsa (DNAsa I grado II, Roche). Para la disgregación del tejido, se incubó el tubo en un baño a 37 °C, dentro de la campana de flujo laminar, durante 10-20 min; tiempo durante el que se realizó un pipeteo suave y continuo para separar las células. Una vez hecho esto, se tomó el sobrenadante, desechando el tejido restante, y se añadieron entre 3-5 ml de suero fetal bovino. Dependiendo del número de ratones neonatos, este ciclo se repitió varias veces, siempre tratando los corazones en grupos de 3.

A continuación, se centrifugaron los tubos con el suero fetal durante 5 min a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células mediante un pipeteo suave, en 1 ml de medio de "cardiomiocitos" (DMEM y M199 (3:1), 5% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo, 20 mM de HEPES, 0,2 ng/ml de cardiotrofina-I (R&D Systems), 1µM de insulina (Sigma) y una mezcla de antibióticos y antifúngicos).

Posteriormente se sembraron las células en platos normales (Falcon) durante 45 min para así eliminar los fibroblastos del sobrenadante. Pasado ese tiempo, el sobrenadante se sembró en platos previamente tratados con colágeno (Collagen from rat tail, Roche Applied Sciences) disuelto en una solución de PBS al 0,2% de ácido acético, para así facilitar la adhesión de los cardiomiocitos.

Después de dos días de estabilización del cultivo primario, se procedió a la inmortalización de las células mediante infección retroviral con la construcción pBABE puro-antígeno T. Las células infectadas fueron seleccionadas por la adición al medio de cultivo del antibiótico de selección, en este caso puromicina, a una concentración de 0,5 µg/ml, durante un tiempo de entre 2 y 3 semanas.

En todos los casos se observó que las células mantenían las mismas propiedades proliferativas tras repetidos pases y procesos de congelación-descongelación.

Una vez superado el tiempo de selección, las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fe-

tal y 0,2 ng/ml de cardiotrofina-1, 20 mM de Hepes y la mezcla de antibióticos y antifúngicos.

2.2. Curva de dosis - respuesta frente un estímulo

Para estudiar cómo responden los cardiomiocitos de ratón frente a varios estímulos, se procedió a la realización de curvas de dosis – respuesta. Así, se sembraron las células y una vez que alcanzaron el 60-70% de confluencia, se procedió a la retirada de suero durante 15 horas. En el caso del ácido oleico se utilizó un medio de retirada con 0,5% de suero fetal y 500 μ M de albúmina, para intentar reproducir *in vitro* la situación que ocurre en diabetes.

Una vez transcurrido ese tiempo, se estimularon las células con concentraciones crecientes de insulina en un rango desde 10 pM a 100 nM, durante un tiempo de 5 minutos.

También se realizaron estimulaciones con ácido oleico, para estudiar como respondían los cardiomiocitos a los ácidos grasos. En este caso los estímulos se llevaron a cabo con concentraciones de entre 200 y 800 μ M, durante una hora.

2.3. Curva de tiempo

Se realizaron curvas de tiempo frente a ambos estímulos: insulina y ácido oleico. Para ello se procedió a la retirada de suero de las células una vez que alcanzaron el 60-70% de confluencia, durante 15 horas.

Los estímulos se llevaron a cabo con 10 nM de insulina y 800 μ M de ácido oleico. Para ambos el tiempo de estimulación fue de 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos.

2.4. Obtención de extractos de proteínas

Las placas de cultivo se lavaron dos veces con PBS frío y posteriormente se lisaron a 4°C (sobre hielo) en 100 - 500 μ l de tampón de lisis (EDTA 5mM, NaCl 50 mM, Pirofosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM,

Na₃VO₄ 100 μM, Tritón X-100 1%, Tris pH 7,6 10 mM, PMSF 1mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM).

Las células se levantaron de la placa mediante raspado y lisado se colocó rápidamente en tubos de 1,5 ml. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos, a continuación se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos para su uso inmediato o congelación a -70°C.

2.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas obtenidas, se realizó mediante el ensayo descrito por Bradford (13). Para ello se usó el agente “Bio-Rad protein assay” (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino (Bio-Rad protein Assay standard H, Bio-Rad) para preparar una curva patrón. La cuantificación se realizó mediante la adición del reactivo de Bradford y la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm.

2.6. Electroforesis de proteínas

Una vez valorados los lisados, se prepararon las muestras de forma que todas contuvieran la misma cantidad de proteínas, alrededor de 20-60 μg, y se mezclaron en proporción 1:1 con un tampón compuesto por: Tris 72 mM pH 7,6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), y β-mercaptoetanol 2 mM. Así preparadas, las muestras se guardaron a -20 °C hasta el momento de la electroforesis (SDS-PAGE). Estas muestras se calentaron a 90-100 °C durante 5 minutos y se cargaron en el gel de electroforesis. En un carril del mismo gel se cargó un patrón de pesos moleculares, con una mezcla de proteínas de tamaños conocidos (*Prestained SDS-PAGE Standards* Bio Rad ref # 161-0318). El porcentaje del gel de poliacrilamida varió en función del tamaño de la proteína que se quería estudiar en cada momento.

2.7. Transferencia de proteínas

Una vez separadas suficientemente las proteínas mediante la electroforesis se procedió a la transferencia de las mismas a una mem-

brana de poli vinil difluoruro o PVDF (*Immobilon-P*®) mediante el paso de corriente eléctrica. Esta transferencia se realizó según dos métodos: utilizando el equipo de transferencia *Trans-blot SD Semy-dry* de Bio Rad y un tampón compuesto por glicina 40 mM, metanol al 20% (v/v) y Tris 48 mM pH 8,3; a 15 V durante un tiempo variable en función del tamaño del gel, el espesor y porcentaje de acrilamida del mismo y el tamaño de la proteína en estudio. Y para la transferencia de proteínas de alto peso molecular, se utilizó el equipo de transferencia por húmedo de Bio Rad y un tampón compuesto por: glicina 386 mM, SDS 0,1 %, metanol 20% y Tris 66 mM pH 8,5. Esta transferencia se lleva a cabo a 100 V durante 2 horas.

Finalizada la transferencia, se realizó el bloqueo o saturación de todos los sitios inespecíficos de unión de proteínas en la membrana de PVDF. Para ello, la membrana fue incubada 2 horas con agitación suave en solución de bloqueo, preparada con TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,3) suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) o BSA al 3% (p/v). Posteriormente, se eliminó este tampón y se añadió el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20), incubándose con agitación suave a 4 °C durante toda la noche. Tras esta incubación se realizaron 4 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con el tampón de lavado TTBS. A continuación se añadió el anticuerpo secundario (un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón o conejo y conjugado con una peroxidasa de rábano) y con él se incubó la membrana de polivinilo durante al menos 1 hora a 4°C. Finalmente se realizaron otros 4 lavados con TTBS y se procedió al revelado, consistente en la detección de la peroxidasa fijada mediante una técnica quimioluminiscente, utilizando el equipo de detección comercializado por Amersham (ECL) y películas fotográficas de alta sensibilidad de la misma casa.

2.8. Medida de la captación celular de glucosa

La línea celular en estudio, sin suero y con medio bajo en glucosa durante 4 horas, se lavó 3 veces con medio KRH (NaCl 136mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 1mM, MgSO₄ 1mM, Hepes 20mM, 1% BSA) y seguidamente se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 1 ml de KRH en presencia o ausencia de insulina (10-100 nM). La incubación con in-

hibidores de la proteína PI3K, se realizó durante 30 minutos previos en el mismo medio de privación, a una concentración de 40 nM de Wortmanina y 10 nM de LY 294002 (ambos de Sigma). Por último, la incubación con ácido oleico (Sigma) se realizó durante 1 hora a una concentración de 800 μ M. Todos los estímulos se mantuvieron durante la incorporación de glucosa tritiada. La incorporación de 2-deoxy-D-(1-³H)-glucosa (500 nCi/ml, Amersham Biosciences) se midió durante los últimos 10 minutos de incubación. Transcurrido este tiempo las células se lavaron 3 veces con KRH y se solubilizaron en 1 ml – 500 μ l de SDS 0,1%. La radiactividad de una alícuota de 200 μ l fue determinada en 2 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold®) en un contador de radiación beta.

3. RESULTADOS

Para la inmortalización de los cardiomiocitos se obtuvo primero el DNA del antígeno T mediante purificación de la banda del gel de agarosa. Una vez transfectadas con el DNA, y después de la selección con puromicina, se comprobó la inmortalización mediante western blot contra antígeno T y contra p53. La presencia de ambas proteínas confirma que las células son inmortales (Figura 1).

Para comprobar que las células inmortalizadas y seleccionadas son realmente cardiomiocitos y se eliminó la contaminación por otros tipos celulares como fibroblastos, estas células deben poseer la fracción específica de corazón de la proteína Troponina T, como así se demuestra en el western blot directo realizado (Figura 2A).

En determinados tejidos, al inmortalizar las líneas celulares, se puede producir un cambio en la relación de expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, lo que posteriormente puede repercutir en la señalización celular. Se realizó un western blot contra estos transportadores, comparando los cardiomiocitos obtenidos con otros tipos celulares y con tejidos (Figura 2B). Se puede observar que la expresión de Glut 4 en cardiomiocitos neonatales es muy inferior a la de otros tipos celulares.

Se caracterizó la ruta de señalización intracelular de la insulina (Figura 2C) y se observó que los cardiomiocitos neonatales expresan ya

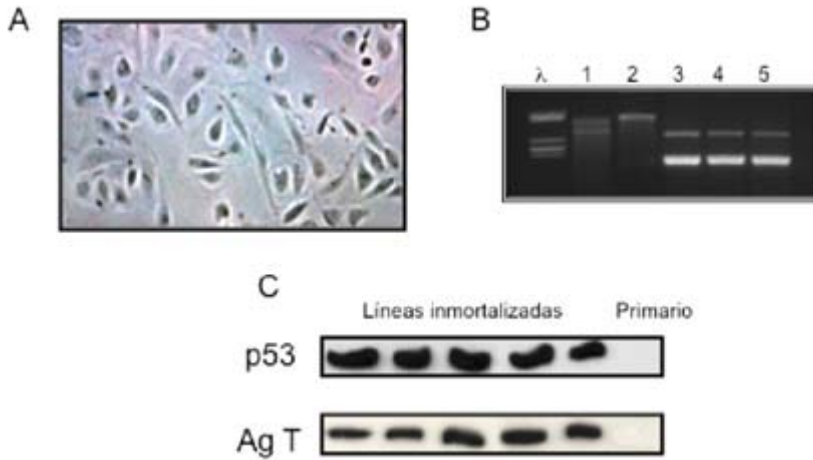


Figura 1. **A** Fotografía en campo claro de los cardiomiocitos en cultivo. **B.** Plásmido con Antígeno T sin digerir y digerido con dos enzimas de restricción para la obtención del inserto que se usará para transfectar. **C.** Comprobación de la inmortalización mediante western blot contra antígeno T y p53.

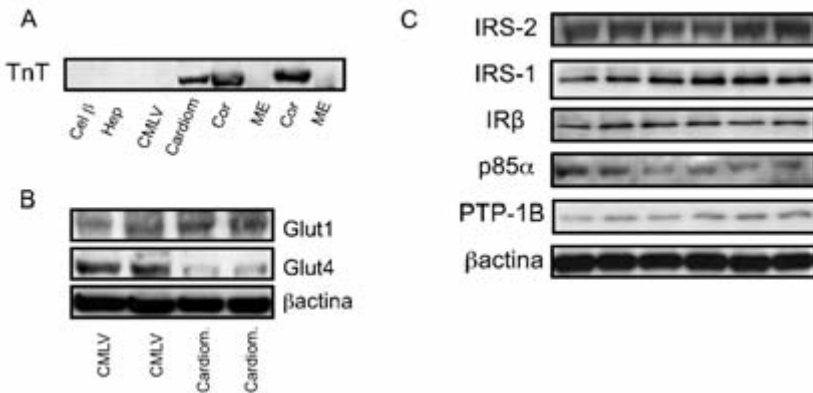


Figura 2. **A.** Presencia de Troponina T para confirmar que las células son cardiomiocitos, mediante comparación con distintos tipos celulares y tejidos (Cel β: células beta; Hep: hepatocito; CMLV: célula muscular lisa vascular; Cardiom: cardiomiocito; Cor: corazón; ME: músculo esquelético.). **B.** Expresión de Glut4 y Glut1 en distintos tipos celulares. **C.** Caracterización de la ruta de señalización intracelular de la insulina en cardiomiocitos.

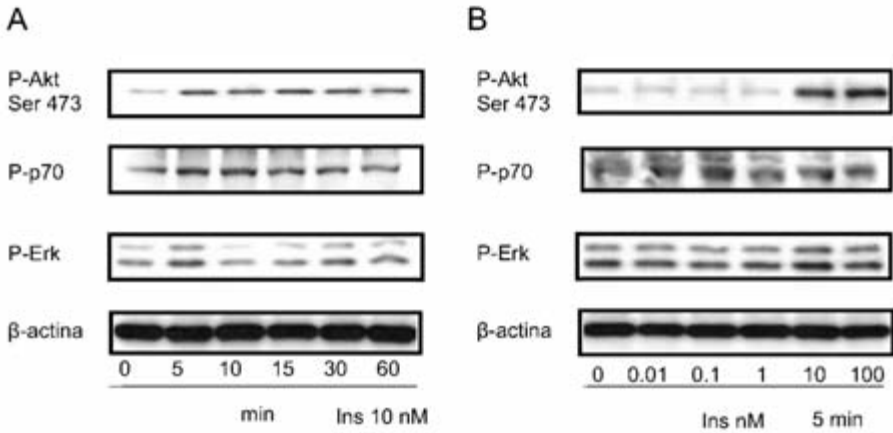


Figura 3. Estudio de distintas proteínas de la cascada de señalización de la insulina durante una curva de tiempo (A) y un experimento de dosis-respuesta (B), ambos frente a un estímulo de insulina.

muchas de las proteínas implicadas en la ruta de señalización de la insulina.

El estudio de la curva dosis-respuesta frente a insulina (Figura 3A) permite conocer la menor concentración de dicha hormona que estimula la ruta de señalización intracelular de los cardiomiocitos.

En la curva de tiempo (Figura 3B) se puede observar que la insulina a concentración de 10 nM causa una estimulación tras 5 minutos de presencia en el medio. Para todas las proteínas estudiadas, el estímulo se mantiene de forma sostenida hasta el final del experimento, aunque va decayendo poco a poco a medida que avanza el tiempo.

En la curva de tiempo (Figura 4), se observa una alta estimulación en el tiempo 0 en las proteínas relacionadas con la β -oxidación de los ácidos grasos. Al relacionar la cantidad de proteína existente, con la cantidad de proteína fosforilada, observamos dos patrones distintos. En el caso de la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), se observa que desde el primer momento hay mucha proteína fosforilada en relación con la proteína total no fosforilada (esto es, en su forma inactiva). Este efecto no se atenúa de manera tiempo-dependiente. Luego se podría decir que, el

ácido oleico a una concentración de 800 μM , inactiva a la ACC de manera tiempo-independiente. En el caso de la quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) se observa que al principio del tratamiento se encuentra fosforilada (activa). La fosforilación (normalizada) de la AMPK es máxima a altas concentraciones de ácidos grasos, como se deduce de los datos de la curva dosis-respuesta a ácidos grasos (Figura 4). Sin embargo, la cantidad normalizada de AMPK fosforilada es cada vez menor de manera tiempo-dependiente. Estos resultados parecen sugerir que los ácidos grasos a altas concentraciones (800 μM) inactivan a la ACC a lo largo del tiempo de manera independiente de AMPK.

Respecto a la captación celular de glucosa (Figura 5), no se observa una respuesta a la acción de la insulina mucho mayor que el transporte basal. De hecho, independientemente de los estímulos utilizados no hay una respuesta estadísticamente significativa.

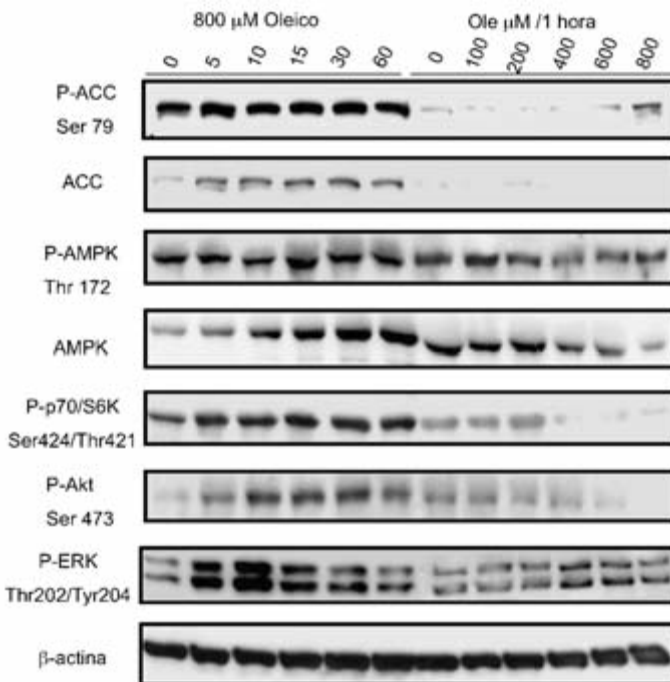


Figura 4. Estudio de distintas proteínas relacionadas con los ácidos grasos durante una curva de tiempo y un experimento de dosis-respuesta, frente a estímulos con ácido oleico.

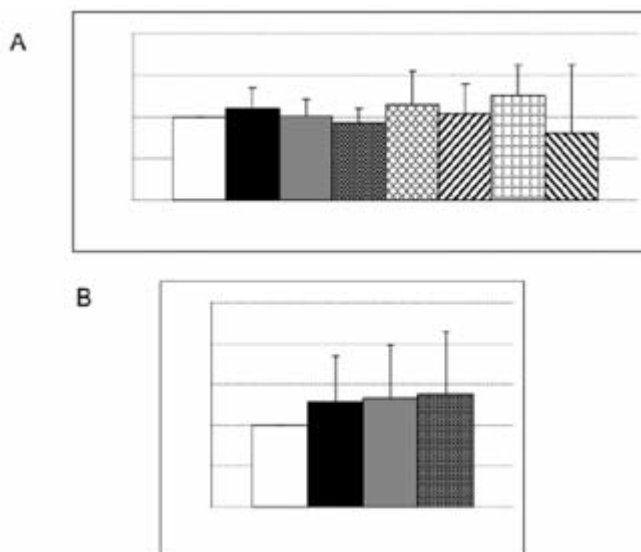


Figura 5. Captación celular de glucosa en células estimuladas con Insulina (10-100 nM) y Wortmanina (40 nM) (A) y en células estimuladas con Insulina (10-100 nM), Ácido oleico (800 μ M) y LY 294002 (10 nM). (B) Los valores se expresan como media+SEM.

4. DISCUSIÓN

Durante el período fetal y neonatal, hasta que se realiza el cambio a un metabolismo adulto, el corazón y por tanto los cardiomiocitos, tienen principalmente un metabolismo glucídico (14).

En la línea celular obtenida en este trabajo, se observa que hay un estímulo causado por la insulina a las concentraciones más altas utilizadas en el experimento (Figura 3), luego en principio estas células serían sensibles a la acción de la insulina.

En el caso de los ácidos grasos representados en este trabajo por el ácido oleico (Figura 4), se observa que la activación del metabolismo oxidativo ocurre muy rápidamente. Hay que tener en cuenta que este experimento se realizó en unas condiciones que intentan mimetizar el medio diabético. En los primeros estudios del sustrato metabólico del corazón humano, en los que se incluyeron pacientes

diabéticos, ya se observó que en ellos se produce un descenso de la asimilación de glucosa, mientras que la asimilación de ácidos grasos aumenta (15). Este hecho podría relacionarse con el hecho de que la quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) sufra un descenso de la relación forma activa/inactiva; de forma que a medida que vaya aumentando su forma inactiva, dejará de ejercer su efecto inhibitor sobre la Acetil- CoA Carboxilasa (ACC). Sin embargo, la ACC se mantiene fosforilada e inactiva a lo largo del tiempo, a altas concentraciones de ácidos grasos, lo cual sugiere una inactivación de la ACC independiente de la AMPK. Ello, supondría mantener inactiva la ACC y por tanto, aumentado el acceso de los ácidos grasos a la mitocondria y su consiguiente oxidación.

Se sabe que los ácidos grasos empeoran la asimilación de glucosa mediada por insulina. De hecho, se ha mostrado de forma repetida y consistente que la alimentación alta en grasas empeora la tolerancia a la glucosa y disminuye la sensibilidad a la acción de la insulina en músculo (16, 17), aunque el mecanismo exacto por el que los ácidos grasos inhiben la acción de la insulina todavía es desconocido. Estudios recientes sugieren un papel de varias isoformas de la proteína proteína quinasa C (PKC), especialmente de PKC θ y PKC ϵ (18). Estas quinasas podrían activarse de dos formas, o bien directamente debido a la alta generación de diacilglicerol, o indirectamente por un incremento de las concentraciones de acil-CoA de cadena larga. Este incremento del acil-CoA estaría causado por un desequilibrio de las tasas de disponibilidad y/o asimilación de los ácidos grasos y la β -oxidación de los mismos. La relación de ácidos grasos y de la actividad PKC ha sido observada en músculo esquelético resistente a la acción de la insulina de rata (19).

Se sabe que los ácidos grasos estimulan la vía ERK/MAPK en cardiomiocitos neonatales de ratón y también que tienen un papel protector a través de esta vía en situaciones de isquemia y reperfusión (20). Por tanto, no es sorprendente que en presencia de ácido oleico en el medio, a los 5 minutos de exposición, se produzca una gran activación de estas proteínas; activación que se hace máxima a los 10 minutos, pero que sin embargo decae de forma muy rápida a tiempos posteriores.

En cuanto al transporte de glucosa (Figura 5), el efecto causado por los distintos estímulos, posiblemente se ve minimizado por el alto

transporte basal encontrado. Lo que provoca que nos hagamos la pregunta de ¿por qué existe esa alta captación de glucosa en el estado basal? La respuesta podría estar en el balance de los transportadores de glucosa, teniendo en cuenta que las partes anteriores de la cascada de señalización intracelular de la insulina ya fueron analizadas, y aparentemente tenían un comportamiento normal que indicaba una sensibilidad a la acción de la hormona. Si el ratio GLUT1/GLUT4 se ve desplazado hacia el primero, causaría que el transporte se viera facilitado de forma independiente de insulina y por ello, al estimular con la hormona la cantidad de GLUT4 disponible para el transporte sería tan baja que apenas repercutiría en el transporte inespecífico de GLUT1. De la misma forma, no se vería afectado por los inhibidores de la PI3K. El hecho de que GLUT1 esté aumentado se explica porque es el principal transportador de la insulina en el corazón embrionario, aunque poco después del nacimiento ocurre un cambio de expresión, disminuyendo las concentraciones de GLUT1 y aumentando las de GLUT4, aunque de todas formas, esto no evita que GLUT1 sea un transportador muy importante en el corazón neonatal (21).

Otra posibilidad es que falle la maquinaria de translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y por ello, aunque las concentraciones de GLUT1 sean altas y el transporte basal sea también alto, el que GLUT4 no funcione hace que no se produzca la captación de glucosa.

La tercera posibilidad es que a pesar de ser cardiomiocitos neonatales y en principio su metabolismo sea glucídico, puede que una parte muy importante de la obtención de energía se produzca a través de las enzimas β -oxidativas, como puede ser la AMPK. En un estudio realizado en cardiomiocitos con biguanidas e insulina, se describió que existe un transporte de insulina comparable a través de la insulina y a través de la AMPK, y que ambos transportes serían inhibidos por LY 294002, luego ambos transportes inducidos de la glucosa serían PI 3 quinasa-dependientes. Además, en ausencia de insulina, la AMPK tendría un efecto aditivo con la activación de Akt (22). Esto podría explicar que en nuestras células no haya transporte de glucosa importante en presencia de insulina, ni que lo haya en presencia de oleico, ya que este ácido graso a altas concentraciones provoca una inactivación de la AMPK de manera tiempo-dependiente.

En resumen:

1. Hemos obtenido una nueva línea de cardiomiocitos neonatales capaces de estimular las cascadas de señalización dependientes de insulina. Igualmente, responden a los ácidos grasos libres. En consecuencia, la nueva línea celular es válida para estudiar la señalización celular en respuesta a la insulina y su regulación por ácidos grasos libres.
2. Los cardiomiocitos neonatales no aumentan el consumo de glucosa en respuesta a insulina o ácidos grasos libres, debido a los bajos niveles de expresión de GLUT-4. En consecuencia, los cardiomiocitos neonatales muestran una clara resistencia a la insulina en lo que al consumo de glucosa se refiere.
3. Dado que los cardiomiocitos de los pacientes diabéticos muestran bajos niveles de GLUT-4 y resistencia a la insulina, los cardiomiocitos neonatales de ratón pueden ser un modelo válido para el estudio de la resistencia de la insulina en el consumo de glucosa.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido llevado a cabo dentro del proyecto SAF2005/0014 en colaboración con el Fondo Social Europeo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Haffner, S. & Taegtmeier, H. (2003) Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation*. 108 (13): 1541-1545.
2. Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104 (4): 517-529.
3. Depre, C., Vanoverschelde, J.L. & Taegtmeier, H. (1999) Glucose for the heart. *Circulation*. 99 (4): 578-588.
4. Taegtmeier, H., McNulty, P. & Young, M.E. (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation*. 105 (14): 1727-1733.
5. Young, M.E., McNulty, P. & Taegtmeier, H. (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation*. 105 (15): 1861-1870.

6. Severson, D.L. (2004) Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82 (10): 813-823.
7. Randle, P.J., Garland, P. B., Hales, C.N. & Newsholme, E. A. (1963) The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1: 785- 789.
8. Taegtmeyer, H., Hems, R. & Krebs, H. A. (1980) Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* 186 (3): 701-711.
9. Saha, A. K., Vavvas, D., Kurowski, T. G., Apazidis, A., Witters, L. A., Shafir, E. & Ruderman, N. B. (1997) Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 272: E641-648.
10. DeFronzo, R.A. (1988) The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 37 (6): 667-687.
11. Belke, D. D., Betuing, S., Tuttle, M. J., Graveleau, C., Young, M. E., Pham, M., Zhang, D., Cooksey, R. C., McClain, D. A., Litwin, S. E., Taegtmeyer, H., Severson, D., Kahn, C.R. & Abel, E. D. (2002) Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J. Clin. Invest.* 109 (5): 629-639.
12. Abel, E. D. (2004) Glucose transport in the heart. *Front. Biosci.* 9: 201-215.
13. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Hocquette, J. F., Sauerwein, H., Higashiyama, Y., Picard, B. & Abe, H. (2006) Prenatal developmental changes in glucose transporters, intermediary metabolism and hormonal receptors related to the IGF/insulin-glucose axis in the heart and adipose tissue of bovines. *Reprod. Nutr. Dev.* 46 (3): 257-272.
15. Ungar, I., Gilbert, M., Siegel, A., Blain, J. M. & Bing, R. J. (1955) Studies on myocardial metabolism. IV. Myocardial metabolism in diabetes. *Am. J. Med.* 18 (3): 385- 396.
16. Kim, J. Y., Nolte, L. A., Hansen, P. A., Han, D. H., Ferguson, K., Thompson, P. A. & Holloszy, J.O. (2000) High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (6): R2057-2065.
17. Storlien, L. H., James, D. E., Burleigh, K. M., Chisholm, D. J. & Kraegen, E. W. (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251 (5 Pt 1): E576-583.
18. Itani, S. I., Zhou, Q., Pories, W. J., MacDonald, K. G. & Dohm, G. L. (2000) Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes.* 49 (8): 1353-1358.
19. Laybutt, D. R., Schmitz-Peiffer, C., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Biden, T. J. & Kraegen, E. W. (1999) Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am. J. Physiol.* 277 (6 Pt 1): E1070- 1076.
20. Engelbrecht, A. M., Engelbrecht, P., Genade, S., Niesler, C., Page, C., Smuts, M. & Lochner, A. (2005) Long-chain polyunsaturated fatty acids protect the heart against ischemia/reperfusion-induced injury via a MAPK dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (6): 940-54.

21. Smoak, I. W. & Branch, S. (2000) Glut-1 expression and its response to hypoglycemia in the embryonic mouse heart. *Anat. Embryol. (Berl)*. 201 (5): 327-333.
22. Bertrand, L., Ginion, A., Beauloye, C., Hebert, A. D., Guigas, B., Hue, L. & Vanoverschelde, J. L. (2006) AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (1): H239-50.

***Información de Contacto:**

Dr. Manuel Benito de las Heras.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. UCM.
Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid

Telf: 91 394 17 77. Fax: 91 394 17 79

Email: benito@farm.ucm.es

Lista de abreviaturas: **NEFA**, ácidos grasos no esterificados; **CIRKO**, ratón con delección del receptor de insulina en el corazón; **ACC**, acetyl-CoA carboxilasa; **AMPK**, quinasa dependiente de AMP cíclico; **PKC**, proteína quinasa C; **PKB**, proteína quinasa B; **MAPK**, proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Mono and biexponential models in radioimmunoassay of insulin

Ricardo Díez Montoro¹, M.^a Teresa Salabert Salvador¹, José Luis Moreno Frigols^{1,2,*}

¹ Dpt. of Physical Chemistry. Faculty of Pharmacy. Valencia, Spain.

² Radioisotope Service. Hospital Clínico Universitario. Valencia, Spain.

Recibido el 1 de julio de 2008.

ABSTRACT

Radioimmunoassay (RIA) is a principal method for quantifying serum Insulin concentration. We studied the influence of initial concentration of ¹²⁵I-labeled antigen (M) and unlabeled Insulin (Q), viscosity and temperature on the substitution reaction between Q and the immunocomplex (PM) formed by M and the anti-Insulin antibody (P). The accuracy of this method is critically dependent on such factors. In addition, we propose a kinetic model for this reaction. We used a commercially available RIA kit for Insulin, a gamma counter, and a viscosimeter to study the effect of initial concentration of M, ionic strength, viscosity, and temperature on the substitution reaction between M and Q. Data were analyzed using Statistica software. The apparent rate constant for the reaction between PM and Q is dependent on the initial concentrations of M and Q, and the viscosity of the reaction medium, and temperature, and independent of the ionic strength.

A kinetic model for the displacement of the ¹²⁵I-Insulin by the Insulin in its union to a specific antibody is proposed. Such model adjusts satisfactorily to the results and shows the influence of the variables studied on the sensitivity of the method of RIA on which the analytical determination of the Insulin is based.

Key Words: Concentration; Immunocomplex; Ionic Strength; Kinetics; Substitution Reaction; Temperature; Viscosity.

RESUMEN

Modelos mono y biexponencial en Radioinmunoanálisis de Insulina

El Radioinmunoanálisis (RIA) es uno de los principales métodos para la cuantificación de la concentración sérica de Insulina. Se ha estudiado la influencia de la concentración inicial de ^{125}I - Insulina (M) e Insulina no marcada (Q), viscosidad y temperatura en la reacción de sustitución entre Q y el inmunocomplejo (PM) formado por M y el anticuerpo anti Insulina (P). La exactitud de este método es críticamente dependiente de dichos factores. Además se propone un modelo cinético para esta reacción. Se utilizó un kit comercial de RIA para Insulina, un contador gamma y un viscosímetro para estudiar el efecto de las variables indicadas anteriormente sobre la reacción de sustitución entre M y Q. Los datos se analizaron usando el programa Statistica. La constante aparente de velocidad para la reacción entre PM y Q depende de las concentraciones iniciales de M y Q, de la viscosidad del medio y de la temperatura. Es independiente de la fuerza iónica.

Se propone un modelo cinético para el desplazamiento de la ^{125}I -Insulina por la Insulina en su unión a un anticuerpo específico. Dicho modelo se ajusta satisfactoriamente a los resultados y muestra la influencia de las variables estudiadas sobre la sensibilidad del método de RIA en que se basa la determinación analítica de la Insulina.

Palabras Clave: Concentración; Inmunocomplejo; Fuerza Iónica; Cinética; Reacción de Sustitución; Temperatura; Viscosidad.

1. INTRODUCTION

Radioimmunoassay (RIA) is used in Insulin assessment. The procedure is a solid-phase radioimmunoassay (1), wherein ^{125}I -labeled insulin competes for a fixed time with insulin in the patient sample for

antibody sites. Because the antibody is immobilized to the wall of a polypropylene tube, simply decanting the supernatant suffices to terminate the competition and to isolate the antibody-bound fraction of the radiolabeled insulin. Counting the tube in a gamma counter then yields a number, which converts by way of a calibration curve to a measure of the insulin present in the patient sample. Rodbard, Munson, Ekins (2-4) and others suggested some models for the adjustment of calibration curves, the most widespread and used in current software is that of the four parameters.

Kinetics and equilibrium in antigen-antibody reactions are determining factors in the sensitiveness and accuracy of immunoanalytical techniques (5-7). A diffusion-controlled process must meet some typical requirements such as a considerable reaction rate decrease when medium viscosity is greater, and scarce temperature influence with a reduced energy demand with regards activation, this causing activation enthalpy values to be the same order as the solvent's viscous flow energy (19000 J mol^{-1} for water) (8). Diffusion control for this type of processes has been theoretically studied by Nigren, Stenberg et al (9-13). They proposed an application model for reactions produced in the solid-liquid interphase which provided an equation containing four diffusion influence parameters. Raman (14) also observed diffusion control for monoclonal antibody binding to cytochrome C. Xavier and Wilson (15) studied the association and dissociation reactions of Anti-Hen Egg Lysozyme (HEL) with two of its specific antibodies (HyHEL-5 and HyHEL-10) under pseudo first order conditions for the association, and found diffusion control. The decrease in the reaction rate constants as a result of viscosity turned out to be more drastic than theoretically expected, this aspect being put down to potential osmotic effects. In addition, rate constants were found to approximately double when ionic strength goes down from 500 mM to 27 mM, which indicates that the process occurs between species with opposite charges that affect the orientational requirements of association.

Equilibrium data analysis is largely used in determining the capacity of a substance to bind to one or several receptor populations. Nonetheless, as pointed out by Weber (16), detecting two binding sites through such an assay requires the ligand to have very different affinity for the two binding sites.

In our previous research (17-27) different features relative to the kinetics of antigen-antibody reactions used by immunoanalytical techniques were analysed. Theoretical models were prepared for an application to the immunocomplex formation processes produced in RIA (radioimmunoassay) and IRMA (immunoradiometric assay). We also studied the fitting of equilibrium results to several pre-set equations, and a mathematical deduction that justifies them theoretically was obtained.

We seek to develop a general model applicable to competitive immunoassays including the influence of several variables. Its validation comes from the fitting of the results to the equations obtained. The models of Stenberg (9-13), Rabany (7), and those of Zuber (6) refer to the formation of the radioactive immunocomplex but not to the competition between labelled and unlabelled antigen, which is the basis of competitive immunoassays. Such models do not determine the influence of the variables studied here.

In line with the above research, this paper aims to:

- Produce a kinetic model applicable to the substitution of the labelled antigen bound to the antibody by the unlabelled one, this process being at the foundations of RIA.
- Distinguish between single-site and two-site binding models by analysing kinetic data.
- Determine potential diffusion control.

This must be done in different stages:

- Obtaining integrated rate equations for the overall processes.
- Studying the medium's viscosity influence on reaction kinetics.
- Complementary analysis of ionic strength influence in order to include or rule out the effect of electrical charges.
- To predict the calibration curves showing the influence of the mentioned variables.
- The results must be potentially applicable to the design of immunoanalytical techniques.

2. THEORETICAL MODEL

This is the reaction studied:



P = Anti-Insulin antibody immobilised on the tube wall.

M = ^{125}I -Insulin.

PM = Radioactive immunocomplex.

Q = Insulin.

PQ = Non-radioactive immunocomplex.

The treatment of the reaction kinetic model was exposed in a paper published earlier (24). As it appeared there, the activity of PM in cpm (z) varies over time according to the equation:

$$z = z_e + (z_0 - z_e) \left(\exp(-t (z_0 q \epsilon k'_1 / (z_0 - z_e) + (z_0 - z_e)(k'_{-1} - k'_1))) \right) \quad \text{Eq. 1}$$

z = Activity of PM in cpm, z_0 = initial value of z , z_e = z value in the equilibrium, q = Q concentration (pmol/L), ϵ = Conversion factor concentration-activity, k'_1 = rate constant for the forward reaction, k'_{-1} = rate constant for the reverse reaction, $z_0 q \epsilon k'_1 / (z_0 - z_e) + (z_0 - z_e)(k'_{-1} - k'_1)$ = Apparent rate constant.

Or, for two processes:

$$z = z_{e1} + (z_{01} - z_{e1}) \left(\exp(-t (z_{01} k'_1 + q \epsilon (k'_{-1} - k'_1))) \right) + z_{e2} + (z_{02} - z_{e2}) \left(\exp(-t (z_{02} k'_2 + q \epsilon (k'_{-2} - k'_2))) \right) \quad \text{Eq. 2}$$

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Instruments

ILKB Gammamaster Automatic Gamma Counter.

Brookfield DV-II digital viscosimeter. Viscosity measurements were performed at 60 rpm with a UL ADAPTER at room temperature.

3.2. Reagents

DM = Solution of ^{125}I -labelled Insulin in a protein-based buffer. Estimated concentration ≈ 50 pmol/L.

PT = Plastic tubes with rabbit anti-Insulin immunoglobulin immobilized to the inside wall.

DQ = Insulin standard solutions.

These reagents were included in the Insulin RIA DPC kit.

GL = Glycerol Merck pro analysis.

DS = Solution of NaCl 2.05 M.

Several tube series were prepared as per the Table I.

Table I. **Preparation of Coated Tubes Containing ^{125}I -Insulin**

PT	1-6	7-12	13-18	19-100
DM (mL)	0.25	0.50	0.75	1
H ₂ O (mL)	0.75	0.50	0.25	0

They were left to react overnight. The next day, they were decanted and washed with 2 mL distilled water.

Solutions were prepared as per Table II.

Table II. **Preparation of Solutions Containing Insulin, Glycerol and NaCl**

Solution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DQ (μL)	25	50	75	100	100	100	100	100	100	800
GL (mL)	0	0	0	1	2	3	0	0	0	0
DS (μL)	100	100	100	100	100	100	200	300	400	800
H ₂ O (mL)	7.875	7.850	7.825	6.8	5.8	4.8	7.7	7.6	7.5	62.4
q (pmol/L)	7.84	15.7	23.5	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4

q = Concentration of Insulin

3.3. Experimental Procedure

Activity was measured on tubes 1, 7, 13 and 19 at 0 minutes using a gamma counter. Reaction kinetics were studied by placing 1 mL of the previously mentioned solutions in the plastic coated tubes and letting them react at different times and at 48 hours, this being considered infinite time. Each tube was washed to remove any unbound labeled antibody. Any radioactivity present in the remaining bound labeled antibody was then measured using a gamma counter.

16 experiments were performed, arranged as follows:

— Experiments 1, 2, 3, 4

Study of the influence of ^{125}I - Insulin concentration (m) upon the global reaction using tubes 1-28 and solution 10.

— Experiments 4, 5, 6, 7

Study of the influence of Insulin concentration (q) upon the global reaction using tubes 22-46 and solutions 10,1, 2, 3.

— Experiments 4, 8, 9, 10

Study of the influence of ionic strength (I), using tubes 22-28, 47-64 and solutions 10, 7, 8, 9.

— Experiments 4, 11, 12, 13

Study of the influence of viscosity (η) using tubes 22-28, 65-82 and solutions 10, 4, 5, 6. The final viscosity of the solutions obtained in this manner was determined by comparison with a calibration curve drawn from standard glycerol-water mixes.

— Experiments 4, 14, 15, 16

Study of the influence of temperature (T) using tubes 22-28, 83-100 and solution 10.

3.4. Data Analysis

The Statistica programme (Copyright © StatSoft, Inc., 1993) was used with specific non-linear regression equations. As the statistical criterion (28,29) that allows a choice from different equations, SS and Corrected Akaike's Information Criterion (AIC_c) was used, expressed as

$$AIC_c = N \cdot \ln \left(\frac{SS}{N} \right) + 2P + \frac{2P(P+1)}{N-P-1}$$

where N is the number of points, SS

the addition of residual squares, and p the number of parameters in the equation. The fitting with the lowest AIC_c must be chosen. In order to distinguish equations from monoexponential and biexponential models, AIC_c and ANOVA (F test) were used.

4. RESULTS

Results of z values for experiments 1-16 are shown in Table III.

5. DISCUSSION

5.1. Influence of m (Experiments 1, 2, 3, 4)

The results of experiments 1, 2, 3, 4 are fitted to the equation:

$$z = a \cdot m / (m+b) + (c \cdot m / (m+d) - a \cdot m / (m+b)) \cdot (\exp(-t \cdot e)) \quad \text{Eq. 3}$$

Its parameters, coefficient of correlation (r), sum of squares of residuals (s) and AIC_c are:

$$a = 4399, b = 80.4, c = 51993, d = 341, e = 0.0858, r = 0.984, s = 5.59 \cdot 10^6, AIC_c = 357.72.$$

Or to:

$$z = a \cdot m / (m+b) + (c \cdot m / (m+d) - a \cdot m / (m+b)) \cdot (\exp(-t \cdot e)) + f \cdot m + (g \cdot m / (m+h) - f \cdot m) \cdot (\exp(-t \cdot j)) \quad \text{Eq. 4}$$

Its parameters, coefficient of correlation, sum of squares of residuals and AIC_c are:

$$a = 5577, b = 92.0, c = 52007, d = 340, e = 0.1053, f = 0.462, g = 1.295, h = -69.6, j = -0.00269, r = 0.998, s = 7.785 \cdot 10^5, AIC_c = 319.46$$

Table III. z values for experiments 1-16

T (min)	0	15	30	45	60	75	Infinite	m	Q	I	η	T
z_1	3423	1683	1326	1000	930	925	761	25	31.4	0.0256	1.385	318
z_2	6673	2744	2574	2354	2131	1928	660	50	31.4	0.0256	1.385	318
z_3	9581	3870	3058	2504	2471	2291	1750	75	31.4	0.0256	1.385	318
z_4	11747	4679	3404	2900	2898	2878	913	100	31.4	0.0256	1.385	318
z_5	11747	6379	5317	4647	3005	2966	1836	100	7.84	0.0256	1.385	318
z_6	11747	5223	4852	4285	3775	3614	2662	100	15.7	0.0256	1.385	318
z_7	11747	4824	3977	3500	2917	2746	2379	100	23.5	0.0256	1.385	318
z_8	11747	4606	4128	3451	2501	2363	2066	100	31.4	0.0513	1.385	318
z_9	11747	4626	3115	2996	2758	2595	2147	100	31.4	0.0769	1.385	318
z_{10}	11747	4818	3264	2807	2692	2411	1756	100	31.4	0.1026	1.385	318
z_{11}	11747	4711	4123	3368	3136	2846	1794	100	31.4	0.0256	1.478	318
z_{12}	11747	5048	4074	3357	2806	2353	1740	100	31.4	0.0256	1.677	318
z_{13}	11747	6058	4827	3928	3122	2692	1407	100	31.4	0.0256	1.980	318
z_{14}	11747	8429	6085	5845	5527	5190	2478	100	31.4	0.0256	1.385	310
z_{15}	11747	8891	8645	8224	7993	7370	4132	100	31.4	0.0256	1.385	303
z_{16}	11747	10466	9776	9713	8464	8423	5593	100	31.4	0.0256	1.385	295

z = activity (cpm) of PM immunocomplex. The subscript indicates the experience number.

m = M initial concentration (relative units).

Q = Q initial concentration pmol/L).

I = ionic strength (molL⁻¹).

η = viscosity (mPa.s).

T = Temperature (K).

The values of AICc indicate that the Eq. 4 is significantly better than Eq. 3. The fact that the equation Eq. 4 is biexponential indicates that the process consist of two different chemical reactions. It also happens with the other studied variables, although the comparison is included only in this case.

Eq. 4 is obtained from Eq. 2 by substitution:

$$z = z_{e1} + (z_{01} - z_{e1})(\exp(-t(z_{01}k'_1 + q\lambda(k'_{-1} - k'_1)))) + z_{e2} + (z_{02} - z_{e2})(\exp(-t(z_{02}k'_2 + q\epsilon(k'_{-2} - k'_2)))) \quad \text{Eq. 2}$$

$$z_{e1} = a \cdot m / (m + b) \quad \text{(Langmuir)}$$

$$z_{01} = c \cdot m / (m + d) \quad \text{(Langmuir)}$$

$$z_{01}k'_1 + q\epsilon(k'_{-1} - k'_1) = e$$

$$z_{e2} = f \cdot m$$

$$z_{02} = g \cdot m / (m + h) \quad \text{(Langmuir)}$$

$$z_{02}k'_2 + q\epsilon(k'_{-2} - k'_2) = j$$

Eq. 4 shows that the initially obtained z values are dependent of m as per Langmuir model (30). The z values at equilibrium are directly proportional to z_0 (empirical observation). The apparent rate constants are independent from z_0 , and therefore of m. This is explained admitting that the used concentrations of tracer are significantly inferior to those of Insulin.

5.2. Influence of q (Experiments 4, 5, 6, 7)

The results of experiments 4,5,6,7 are fitted to the equation:

$$z = (a - b \cdot q) + (c + d \cdot q) \cdot \exp(-t \cdot (e + q \cdot f)) + (g + h \cdot q) \cdot \exp(-t \cdot (j + q \cdot k)) \quad \text{Eq. 5}$$

Its parameters, coefficient of correlation and sum of squares of residuals are:

$$a = 2554, b = 32.3, c = 1976, d = 193, e = 5.17, f = -50.5 \cdot 10^{-3}, g = 7216, h = -160.7, j = 0.0297, k = -0.669 \cdot 10^{-3}, r = 0.995, s = 2.84 \cdot 10^6$$

Eq. 5 is obtained from Eq. 2 by substitution:

$$z_{e1} + z_{e2} = a - b \cdot q$$

$$\begin{aligned}
 z_{01}-z_{e1} &= c+d\cdot q \\
 z_{01}k'_1+q\varepsilon (k'_{-1}-k'_1) &= e+q\cdot f \\
 z_{02}-z_{e2} &= g+h\cdot q \\
 z_{02}k'_2+q\lambda (k'_{-2}-k'_2) &= j+q\cdot k\cdot 0.001
 \end{aligned}$$

The negative values of f and k indicate that k'_1 is greater than k'_{-1} , and k'_2 greater than k'_{-2} . Values of z in the equilibrium depend linearly on q . This suggests that used values of q are in the range of low concentrations. The apparent rate constant for the process (kf) is linearly dependent on the initial concentration of insulin.

5.3. Influence of I (Experiments 4, 8, 9, 10)

The results of experiments 4, 8, 9, 10 are fitted to the equation:

$$z = a+b\cdot\exp(-t\cdot c)+d\cdot\exp(-t\cdot e) \quad \text{Eq. 6}$$

Its parameters, coefficient of correlation and sum of squares of residuals are:

$$a = 1722, b = 7549, c = 0.1364, d = 2476, e = 0.01455, r = 0.996, s = 2.217\cdot 10^6$$

The rate constant is independent of the ionic strength. It indicates that the reaccionantes species do not have electrical charge.

5.4. Influence of η (Experiments 4, 11, 12, 13)

The results of experiments 4, 11, 12, 13 are fitted to the equation:

$$z = a/(1+b\cdot\eta)+c\cdot\exp(-t\cdot d/\eta)+e\cdot\exp(-t\cdot f/\eta) \quad \text{Eq. 7}$$

Its parameters, coefficient of correlation and sum of squares of residuals are:

$$a = 1214, b = -0.1093, c = 6595, d = 0.231, e = 3673, f = 0.0235, r = 0.996, s = 2.071\cdot 10^6$$

For reactions between spherical molecules, nonionic and of similar sizes, (31) one is fulfilled:

$$k = 8RT/3\eta$$

Eq. 7 is obtained from Eq. 2 by substitution:

$$z_{e1} + z_{e2} = a/(1+b\cdot\eta)$$

$$z_{01}-z_{e1} = c$$

$$z_{01}k'_1+q(k'_{-1}-k'_1) = d/\eta$$

$$z_{02}-z_{e2} = e$$

$$z_{02}k'_2+q(k'_{-2}-k'_2) = f/\eta$$

The rate and equilibrium constants are inversely proportional to the viscosity of the medium, as it corresponds to molecules with spherical symmetry, nonionic and of similar sizes. For constant values of m , q and T , the activity in the equilibrium diminishes when it increases viscosity.

5.5. Influence of T (Experiments 4, 14, 15, 16)

The results of experiments 4, 14, 15, 16 are fitted to the equation:

$$z = a \cdot \exp(b/T) + c \cdot \exp(d/T) \cdot \exp(-t \cdot e \cdot \exp(-f/T)) + g \cdot \exp(h/T) \cdot \exp(-t \cdot j \cdot \exp(-k/T))$$

Eq. 8

Its parameters, coefficient of correlation and sum of squares of residuals are:

$$a = -0.445 \cdot 10^{-12}, b = 11355, c = 1.893 \cdot 10^9, d = -3913, e = 3.21 \cdot 10^7, f = 6215, g = 0.1279 \cdot 10^{-6}, h = 7737, j = 29.7 \cdot 10^7, k = 8601, r = 0.994, s = 3.208 \cdot 10^{60}$$

The equilibrium constant is related to the temperature according to the equation of van t'Hoff (32):

$$K = A \cdot \exp(-\Delta H^0/RT)$$

The rate constant is related to the temperature according to the equation of Eyring (33):

$$k = B \cdot T \cdot \exp(-\Delta H^\ddagger/RT)$$

Eq. 8 is obtained from Eq. 5 introducing:

K (van t'Hoff) in b, d, h,

k (Eyring) in e and j, grouping the constants and simplifying.

The activation parameters are:

$$\Delta H_1^0 = 3913 \cdot 8.31 = 32517 \text{ J mol}^{-1} \quad \Delta H_2^0 = -7737 \cdot 8.31 = -64294 \text{ J mol}^{-1}$$

$$\Delta H_1^\ddagger = 6215 \cdot 8.31 = 51647 \text{ J mol}^{-1} \quad \Delta H_2^\ddagger = 8601 \cdot 8.31 = 71474 \text{ J mol}^{-1}$$

When temperature increases, the concentration of PQ in equilibrium and the apparent rate constant increase, according to Eyring and van't Hoff equations.

Process 1 is endothermic and 2 exothermic. The diminution of ze when increasing the temperature can be explained admitting that process 2 predominates on the 1. The activation energies are much greater than the energy of viscous flow of the water. It indicates that the process is not controlled by diffusion.

5.6. Influence of m, q, I, η, T (Experiments 1–16)

The results of experiments 1-16 are fitted to the equation:

$$z = (a \cdot b \cdot q) \cdot m \cdot \exp(c/T) + d \cdot \exp(e/T) \cdot (m/(m+f)) \cdot \exp(-t \cdot (g/\eta)) \cdot \exp(-h/T) + j \cdot (m/(m+k)) \cdot \exp(n/T) \cdot \exp(-t \cdot (u/\eta)) \cdot \exp(-w/T) \quad \text{Eq. 9}$$

Its parameters, coefficient of correlation and sum of squares of residuals are:

$a = -0.1529 \cdot 10^{-15}$	$b = 0.234 \cdot 10^{-15}$	$c = 11595$	$d = 2.87 \cdot 10^9$	$e = -3492$
$f = 469$	$g = 47.5 \cdot 10^7$	$h = 6995$	$j = 0.1892 \cdot 10^{-6}$	$k = 188.3$
$n = 7919$	$u = 0.1042 \cdot 10^7$	$w = 6152$	$r = 0.992$	$s = 1.885 \cdot 10^7$

Eq. 9 contains the influence of all the studied variables. The adjustment of the data of Table III ($n = 112$) to the Eq. 9 can be observed in Figure 1.

6. CONCLUSIONS

- **Conclusion 1.** In the reaction two process occur simultaneously, that could correspond to different epitopes. The initial activity of the radioactive immunocomplex (z_0) is dependent on m , as per Langmuir's model. The apparent rate constants for the process (k_f) is independent of m .
- **Conclusion 2.** Activity in equilibrium (z_e) is directly proportional to z_0 , and therefore it also depends on m , as per Langmuir's equation. As a consequence, the RIA calibration curves obtained with these reagents must follow the model of the four parameters and provide a good logit-log linear fit.
- **Conclusion 3.** The sensitivity of the method is greater at the most small ist he value of z_e for a given value of q . Since z_e increases if it makes m , it agres to use low values of m . In this way increases sesitivity without the reaction becomes slower.
- **Conclusion 4.** The modification of the ionic strength does not contribute any advantage from the practical point of view.
- **Conclusion 5.** An increase in viscosity provides a greater sensitivity of the technique. Nevertheless, it must be valued that the reaction would become slower, with the consequent increase of the incubation time.
- **Conclusion 6.** The sensitivity of the method is increased making the incubation to temperatures superior to the one of the room, whenever it does not put in danger the thermal stability of the insulin. In addition, the reaction becomes faster.
- **Conclusion 7.** A theoretical model was prepared to study the kinetics of the substitution reaction in the immunocomplex antibody-labelled Insuline (PM) by unlabelled Insuline (Q). Equations linking PM concentration with time, M and Q concentrations, ionic strength, viscosity, and temperature were obtained. Experimental results were satisfactorily fitted to the theoretical model.

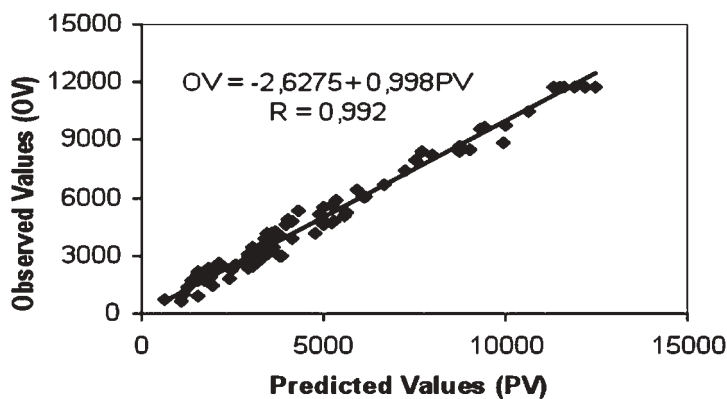


Figure 1. z values observed in experiments 1 – 16 (Table III) vs. values predicted for Eq 9.

7. REFERENCES

1. Yalow, R.S. & Berson, S.A. (1970) General aspects of radioimmunoassay procedures: In vitro procedures with radioisotopes in medicine. Vienna, pp. 455-481
2. Rodbard, D. & McClean, D.S.W. (1977) Automated Computer Analysis for Enzyme-Multiplied Immunological Techniques. *Clin. Chem.* 23/1: 112-115.
3. Guardabasso, V., Rodbard, D. & Munson, P.J. (1987) A dose-response analysis. *Am. J. Physiol.* 252: E357-E364.
4. Edwards, P.R. & Ekins, R. (1982) Development of a microcomputer radioimmunoassay (RIA) data processing program for distribution by the World Health Organization. *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (International Atomic Energy Agency, Vienna)*, pp. 423-441.
5. Zuber, E., Mathis, G. & Flandrois J.P. (1997) Homogeneous Two-Site Immunometric Assay Kinetics as a Theoretical Tool for Data Analysis. *Anal. Biochem.* 251: 79-88.
6. Zuber, E., Rosso, L., Darbouret, B., Socquet, F., Mathis, G. & Flandrois, J.P. (1997) A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay. *J. Immunoassay.* 18: 21-47.
7. Rabbany, et al. (1998) Dissociation rate kinetics in a solid-phase flow immunoassay. *Anal. Letters* 31 (10): 1663-1675.
8. Atkins, G.W. (1998) *Physical Chemistry Sixth Edition. Spanish Translation.* Ediciones Omega, S.A., pp. 865-866.
9. Nygren, H., Werthen, M. & Stenberg, M. (1998) Kinetics of antibody binding to solid-phase-immobilised antigen. Effect of diffusion rate limitation and steric interaction. *J. Immunol. Methods.* 101: 63-71.

10. Nygren, H. & Stenberg, M. (1989) Immunochemistry at interfaces. *Immunology*. 66: 321-327.
11. Stenberg, M. & Stibler, L. (1986) External diffusion in Solid-Phase Immunoassays. *J. Theor. Biol.* 120: 129-140.
12. Stenberg, M. & Nygren, H. (1988) Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J. Immunol. Methods*. 113: 3-15.
13. Stenberg, M., Werthen, M., Theander, S. & Nygren, H. (1988) A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay. *J. Immunol. Methods*. 112: 23-29.
14. Raman, C.S. et al. (1992) Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome c. *Biochemistry*. 31 (42): 10370-9.
15. Xavier, K. & Willson, R.C. (1998) Association and Dissociation Kinetics of Anti-Hen Egg Lysozime Monoclonal Antibodies HyHEL-5 and HyHEL-10. *Biophys. J.* 74: 2036-2045.
16. Weber, G. The binding of small molecules to proteins, in: B. Pullman, M. Weissblut (Eds.) *Molecular Biophysics*, Academic Press, New York, p. 369.
17. Olivas Arroyo, C. & Moreno Frigols, J.L. (2001) Influence of viscosity and ionic strength on the reaction kinetics of aldosterone and androstendione and their specific antibodies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (4): 547-562.
18. Olivas Arroyo, C., Duart Duart, M.J. & Moreno Frigols, J.L. (2002) Kinetics and equilibrium in insulin radioimmunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 23 (4): 407-428.
19. Duart Duart, M.J., Olivas Arroyo, C. & Moreno Frigols, J. L. (2002) Validation of a kinetic model for the reactions in RIA. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (11): 1161-1167.
20. García Gómez, J., Porcar Pons, M. & Moreno Frigols, J.L. (2002) Some kinetic aspects in the immunoradiometric assay of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 307- 315.
21. García Gómez, J. & Moreno Frigols, J.L. (2002) Kinetics and equilibrium in the immunoradiometric assay (IRMA) of Thyroglobuline. *J. Immunoassay Immunochem.* 23 (3): 347-367.
22. García Gómez, J. & Moreno Frigols, J.L. (2003) Comparison between mono- and bi-exponential models for reaction kinetics in the immunoradiometric assay of neuron-specific enolase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33: 891-901.
23. García Gómez, J. & Moreno Frigols, J.L. (2004) Kinetics aspects in the immunoradiometric assay (IRMA) of human Interleukin-1 β (IL-1 β). *CAIJ.* 1 (6): 451-457.
24. García Gómez, J. & Moreno Frigols, J.L. (2005) Influence of concentrations, temperature, ionic strength, and viscosity in the immunoradiometric assay (IRMA) of parathyroid hormone (PTH). *CAIJ.* 2 (1): 28-36.
25. Díez Montoro, R., Salabert Salvador, M.T. & Moreno Frigols, J.L. (2005) Kinetics of Androstendione-Radioactive Immune Complex Substitution Reaction. *J. Immunoassay Immunochem.* 26: 97-107.
26. Díez Montoro, R., Salabert Salvador, M.T. & Moreno Frigols, J.L. (2007) The influence of reactant concentration medium ionic strength, viscosity and temperature on the immune complex substitution reaction in the radioimmunoassay of Aldosterone. *Labmedicine.* 38: 29-34 and 61-63.

27. Díez Montoro, R., Salabert Salvador, M.T. & Moreno Frigols, J.L. (2007) Biexponential model for the kinetics of the substitution reaction in the radioimmunoassay of triiodotironine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 67: 848-858.
28. Motulsky, H.J. & Cristopoulos, A. (2003) Fitting models to biological data using lineal and nonlinear regresion. In: A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc: San Diego CA, www.graphpad.com
29. Burnham, K.P. & Anderson, D.R. (2002) Model selection and multimodel interference. A practical information- theoretic approach by, second edition, Springer.
30. Barrow, G.M. (1988) Physical Chemistry Fourth Edition. Spanish Translation. Editorial Reverté. pp. 889-892.
31. Atkins, G.W. (1998) Physical Chemistry Sixth Edition. Spanish Translation. Ediciones Omega, S.A. p. 866-867.
32. Atkins, G.W. (1998) Physical Chemistry Sixth Edition. Spanish Translation. Ediciones Omega, S.A. pp. 227-229.
33. Atkins, G.W. (1998) Physical Chemistry Sixth Edition. Spanish Translation. Ediciones Omega, S.A. pp. 834-837.

***Correspondence address:**

Dr. José Luis Moreno Frigols.

Dpto. Química Física. Facultad de Farmacia.

Avda. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot (Valencia), Spain.

Tel.: +34 96 3543289. Fax: +34 96 3544892.

e-mail: Jose.L.Moreno@uv.es

Intervención farmacéutica en el seguimiento de la terapia antirretroviral

Salvador Cabrera Figueroa^{1,2,*}, M.^a Paz Valverde Merino¹, M.^a José García Sánchez³, Almudena Sánchez Martín¹, M.^a Carmen González Martín¹

¹ Servicio de Farmacia, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

² Instituto de Farmacia, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Recibido el 4 de septiembre de 2008.

RESUMEN

La eficacia y el alto coste de la terapia antirretroviral exigen un estrecho seguimiento para lograr su máxima efectividad y eficiencia, siendo fundamental el papel del farmacéutico para alcanzarla mediante la individualización de los tratamientos. El objetivo de este estudio ha sido conseguir un adecuado control clínico del paciente VIH+ a través del uso correcto de los medicamentos antirretrovirales prescritos. Para ello se ha puesto en marcha un Programa de Atención Farmacéutica para los pacientes externos VIH+ en tratamiento antirretroviral en un hospital universitario. Después de un año y medio de iniciarlo se han realizado un total de 853 entrevistas en 386 pacientes VIH+ (79,6% del total), consiguiéndose un aumento del 9% en la proporción de pacientes con adherencia óptima. A su vez, se han detectado 1.060 acontecimientos adversos por medicamentos y 513 problemas relacionados con la medicación. En función de ello, se han realizado 1.401 intervenciones en 365 pacientes.

El grado de aceptación de los pacientes al servicio de atención farmacéutica ha alcanzado una puntuación media de 3,27 (escala 0-4).

El número de pacientes cuyas concentraciones plasmáticas de fármacos antirretrovirales se han monitorizado es de 381, con un total de 849 determinaciones. Sólo el 39% de ellas se encontraba dentro de los márgenes terapéuticos aceptados para estos fármacos. Basándose en la información farmacocinética, los clínicos han realizado el ajuste posológico en 16 pacientes.

La experiencia obtenida desde la implantación del programa de seguimiento ha puesto de manifiesto su utilidad para la optimización de los tratamientos con fármacos antirretrovirales.

Palabras clave: Atención farmacéutica; Monitorización de concentraciones plasmáticas; VIH; Ajustes posológicos; Adherencia.

ABSTRACT

Pharmaceutical intervention in the follow-up of antiretroviral therapy.

The elevated cost of antiretroviral treatment demands close follow-up to achieve the effectiveness and efficacy of the treatments implemented, the role of pharmacists in achieving such goals is crucial in the sense that they are mainly involved in directing antiretroviral treatments aimed at generating maximum benefit with the available resources. The aim of the present study was to achieve an appropriate clinical control of HIV+ patients through the correct use of the antiretroviral drugs prescribed.

The study was carried out for external HIV-patients with antiretroviral treatment in a university hospital. One and a half years after implementing a Pharmaceutical Care Program, a total of 853 interviews were obtained from 386 HIV+ patients (79.6% of the total), achieving a 9% increase in optimal adherence. In turn, we observed 1060 adverse drug events and 513 drug related problems. In consequence, we performed 1401 interventions in 365 patients. The degree of patient acceptance of the program had a mean score of 3.7 (scale 0-4).

The number of patients whose antiretroviral plasma concentrations were monitored was 381, with a total of 849 determinations. Only 39% of them were within the therapeutic range established for these drugs. Based on pharmacokinetic information, the clinicians performed a dosage adjustment in 16 patients.

The experience gained since the implementation of the HIV+ patient follow-up program has proved to be useful for the optimisation of treatments using antiretroviral drugs.

Key Words: Pharmaceutical care; Therapeutic drug monitoring; HIV; Dosage adjustment; Adherence.

1. INTRODUCCIÓN

Las beneficiosas consecuencias de la generalización de la terapia antirretroviral (TAR) son indiscutibles, como lo demuestran los significativos descensos en la incidencia de las diversas infecciones oportunistas, la reducción de las hospitalizaciones y el notable incremento en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, estos importantes logros de la TAR han puesto de manifiesto otros problemas, que hasta este momento no habían sido advertidos, como son la presencia de comorbilidades, las interacciones medicamentosas, los efectos secundarios de los fármacos, la aparición de resistencia a los antirretrovirales y la necesidad de conseguir una alta adherencia al tratamiento, que inexcusablemente ha de ser duradera en el tiempo si se quiere lograr un control efectivo y continuado de la replicación viral (1). Por esta razón, deben optimizarse las estrategias disponibles para lograr una supresión viral a largo plazo y, en este sentido, la evidencia emergente sobre la relación entre la exposición a la TAR, su eficacia antiviral y su toxicidad ha llevado a centrar la atención en el papel que desempeña la monitorización de las concentraciones plasmáticas de los antirretrovirales en los pacientes (2, 3).

Se ha demostrado ampliamente que una causa importante del fracaso terapéutico de la TAR es la falta de adherencia al mismo, por lo que, alcanzar el objetivo de un cumplimiento óptimo supone un auténtico reto tanto para el paciente como para el personal sanitario que le atiende (4). Los principales factores que dificultan la adherencia están relacionados con la complejidad del tratamiento y la necesidad de administrar varios medicamentos en diferentes tomas diarias durante periodos prolongados de tiempo al ser un tratamiento crónico; a ello se añade la ausencia de sintomatología de la infección y la presencia de numerosos efectos adversos consecuencia directa del tratamiento, que constituyen una causa frecuente del abandono del mismo.

La atención de los pacientes VIH+ se ha convertido en un área importante de actividad en los servicios de farmacia hospitalaria por su repercusión asistencial, tanto desde el punto de vista clínico como económico (5). El papel del farmacéutico dentro del equipo sanitario que atiende a los pacientes VIH+ se dirige fundamentalmente a la individualización de la TAR para lograr los máximos beneficios con los recursos disponibles.

El objetivo de este estudio ha sido lograr un adecuado control clínico del paciente VIH+ a través de un seguimiento que garantice un uso más correcto de los medicamentos antirretrovirales prescritos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El programa ha sido desarrollado en el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Salamanca (España) en colaboración con el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. Este hospital es de nivel terciario y atiende a una población de 484 pacientes externos con TAR. La valoración de resultados se ha hecho después de un año y medio del inicio del proyecto.

Todos los pacientes VIH+ que recogen medicación antirretroviral en la Unidad de Pacientes Externos del Hospital han formado parte del programa. En el caso de los pacientes menores de edad, la información se ha gestionado con sus tutores.

El programa de seguimiento de pacientes VIH+ comprende el desarrollo de actividades de atención farmacéutica y la monitorización de concentraciones plasmáticas de antirretrovirales. La implantación del mismo se ha realizado mediante una estrecha colaboración entre los farmacéuticos y los médicos que atienden a esta población de pacientes.

2.1. Atención farmacéutica

Las actividades desarrolladas se centran básicamente en el estímulo de la adherencia, la detección de problemas, la información al paciente, y la integración del farmacéutico en el equipo asistencial.

Los pacientes son atendidos personalmente por un farmacéutico en los momentos de inicio o cambio del tratamiento y de forma trimestral coincidiendo con la fecha de la visita médica. También son atendidos sin cita previa siempre que por cualquier motivo lo soliciten.

La entrevista farmacéutico-paciente es diferente en función de que sea la primera vez que se les atiende o sean visitas sucesivas. Los impresos diseñados para estas entrevistas permiten anotar la información aportada por los pacientes y la que el farmacéutico les ha ofrecido. Además, incorporan un apartado en el que se describen las apreciaciones subjetivas del entrevistador respecto a la comprensión y aceptación por el paciente y los problemas a vigilar en la siguiente entrevista (intolerancias, problemas sociales, etc.).

2.1.1. Entrevista preliminar

En ella se pretende contactar por primera vez con el paciente, recoger sus datos personales y hábitos de vida más relevantes, fomentar la adherencia al tratamiento y proporcionarle información personalizada necesaria para el buen uso de los medicamentos prescritos.

2.1.2. Entrevista de control

La entrevista de control es más breve que la inicial y en ella se estimula la comunicación de efectos adversos experimentados, cambios en la medicación concomitante que pudieran dar lugar a interacciones, modificaciones de hábitos de vida, etc.

En los casos de cambios de tratamiento se analizan las causas que motivaron el cambio, con el fin de detectar problemas que pudieran repetirse con el nuevo tratamiento.

Como la adherencia es una actitud dinámica, en cada visita se realiza una estimación de la misma, comparando los resultados con los de la visita anterior para detectar variaciones en el tiempo. Hay que tener en cuenta que en ella influyen un gran número de circunstancias, por lo que se requiere de una evaluación continua y constante mientras dura el tratamiento (5).

Es difícil con un solo método determinar con fiabilidad el grado de adherencia, por lo que se aconseja combinar varios de ellos (6). En nuestro caso disponemos de cuatro estrategias:

Métodos directos:

- Evolución clínica reflejada por los valores analíticos de linfocitos CD4 y carga viral plasmática.
- Concentraciones plasmáticas de medicamentos antirretrovirales.

Métodos indirectos:

- Comprobación del registro de dispensaciones de antirretrovirales en el programa de dispensación individualizada Farmasyst®.
- Un cuestionario validado: el SMAQ (*Simplified medication adherence questionnaire*) (7).

Los datos de adherencia son siempre consultados por el entrevistador previamente a la atención farmacéutica, con el fin de intervenir durante la misma si se considera necesario. También de forma semestral, los resultados de la adherencia medida por el registro de dispensaciones son comunicados a los prescriptores.

En la entrevista se realiza además un seguimiento de la evolución de los valores de carga viral plasmática, recuento de linfocitos CD4 y concentraciones plasmáticas de antirretrovirales. A su vez, se revisan posibles alteraciones analíticas que pudieran ser debidas a efectos adversos de la medicación.

2.2. Monitorización de niveles plasmáticos de antirretrovirales

La monitorización de antirretrovirales nos proporciona una medida de la concentración de medicamento en plasma que, de no ser adecuada, puede revelar problemas atribuibles a interacciones con otros fármacos administrados de forma concomitante, incumplimiento de la prescripción, absorción inadecuada, alteraciones de metabolismo, etc. (8-13). Además, el mantenimiento de concentraciones de medica-

mentos en plasma fuera de los márgenes terapéuticos actualmente aceptados (14) puede conducir al desarrollo de resistencias, toxicidad medicamentosa y/o fracaso de los tratamientos; de aquí la importancia y utilidad de su control.

Los antirretrovirales susceptibles de ser monitorizados comprenden el grupo de los inhibidores de la proteasa y el de los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, ya que son los grupos en los que se ha demostrado una correlación entre concentraciones plasmáticas y respuesta (15). La técnica de HPLC-UV que se ha puesto a punto y validado permite la determinación simultánea de atazanavir, efavirenz, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir (16). A su vez, se ha validado otra técnica (17) (también de HPLC-UV, pero con diferente tratamiento de muestra y condiciones cromatográficas) para la determinación analítica de nevirapina.

Las etapas seguidas incluyen:

- La solicitud por parte del médico de la determinación de niveles plasmáticos de antirretrovirales según el impreso especialmente diseñado para ello. Estos análisis se solicitan de forma trimestral, mediante un procedimiento similar al utilizado en la petición de otro tipo de pruebas analíticas indicativas de la evolución del paciente.
- Extracción de la muestra de sangre en el laboratorio general del hospital. Los análisis son realizados de forma habitual unos quince días antes de la revisión médica. Posteriormente a la extracción, el paciente acude al Servicio de Farmacia para proporcionar la información necesaria para la interpretación de la concentración de fármaco obtenida.
- Separación del plasma e inactivación viral a través de un proceso térmico validado (18).
- Procesado de las muestras: centrifugación, extracción sólido-líquido, evaporación y reconstitución.
- Análisis en duplicado por HPLC-UV.
- Ingreso de los datos en el programa de farmacocinética clínica PKS-Abbott® (19) para la interpretación de los resultados y realización del informe farmacocinético.

- Entrega de los informes al médico solicitante para su inclusión en la historia clínica de cada paciente.
- Archivo de las copias de los informes farmacocinéticos en el Servicio de Farmacia.

Los informes farmacocinéticos incluyen además de la concentración de medicamento en sangre, otros resultados analíticos como enzimas hepáticas, recuento de linfocitos CD4 y carga viral plasmática, así como los resultados obtenidos en farmacia sobre adherencia medida por SMAQ y registro de dispensaciones. Además el informe recoge la interpretación de los resultados de concentraciones plasmáticas para cada fármaco y, considerando todos los datos disponibles, la recomendación de ajustes posológicos u otras modificaciones en la terapéutica en aquellos casos en los que se considere oportuno.

2.3. Comunicación con el equipo asistencial

Se han establecido sistemas de comunicación con los médicos para distintos aspectos relacionados con el tratamiento de los pacientes, de acuerdo al objetivo que se persiga:

- Contacto telefónico o personal entre los farmacéuticos y los médicos para solventar las incidencias diarias más urgentes detectadas en los pacientes.
- Visitas semanales al equipo médico con el fin de intercambiar información sobre los pacientes y sus tratamientos, y debatir sobre las incidencias detectadas. En estas mismas visitas se entregan los informes farmacocinéticos, para que el médico pueda disponer de ellos en la consulta que tiene lugar 15 días después de la extracción de sangre.
- Informes semestrales de adherencia medida de forma indirecta por el registro de dispensaciones.
- Informes anuales que especifican el número de pacientes en tratamiento, consumo de antirretrovirales, coste, detección de pacientes con problemas de medicación, etc.

- Notas informativas sobre otros aspectos relacionados con los medicamentos (nuevas presentaciones, alertas, efectos secundarios descritos, etc.) dirigidas al personal sanitario.

2.4. Variables de medida

Las principales variables de medida de la actividad son:

- Número de pacientes entrevistados y porcentaje respecto al total de pacientes tratados.
- Número de entrevistas.
- Número de intervenciones farmacéuticas.
- Número de pacientes monitorizados
- Número de monitorizaciones.
- Número de ajustes posológicos.

3. RESULTADOS

3.1. Atención Farmacéutica

3.1.1. Entrevistas

Después de un año y medio de iniciado el Programa de Atención Farmacéutica se han realizado un total de 853 entrevistas en 386 pacientes VIH+ con TAR, correspondiente al 79,6% del total de la población atendida en nuestro hospital.

3.1.2. Adherencia

Para evaluar el resultado de las intervenciones realizadas en los pacientes con objeto de optimizar la adherencia, se ha procedido a compararla antes del inicio del programa y después de un año y medio de su desarrollo a través de los registros de dispensaciones. Los resultados obtenidos con este método se muestran en la Figura 1.

Por otra parte, y de acuerdo con los resultados obtenidos con el cuestionario SMAQ aplicado en forma periódica a los pacientes, el 78,0% de ellos se clasifican como adherentes.

3.1.3. Acontecimientos adversos por medicamentos (AAM)

Durante el primer año y medio de desarrollo del programa se han detectado 1.060 AAM, entendiéndolos como “un daño grave o leve causado por el uso (incluyendo la falta de uso) de un medicamento” (20). Los AAM encontrados y clasificados en función de las alteraciones a que dan lugar se reflejan en la Figura 2.

3.1.4. Problemas relacionados con la medicación (PRM)

Los PRM se definen como “resultados clínicos negativos, derivados de la farmacoterapia que, producidos por diversas causas, conducen a la no consecución del objetivo terapéutico o a la aparición de efectos no deseados” (21).

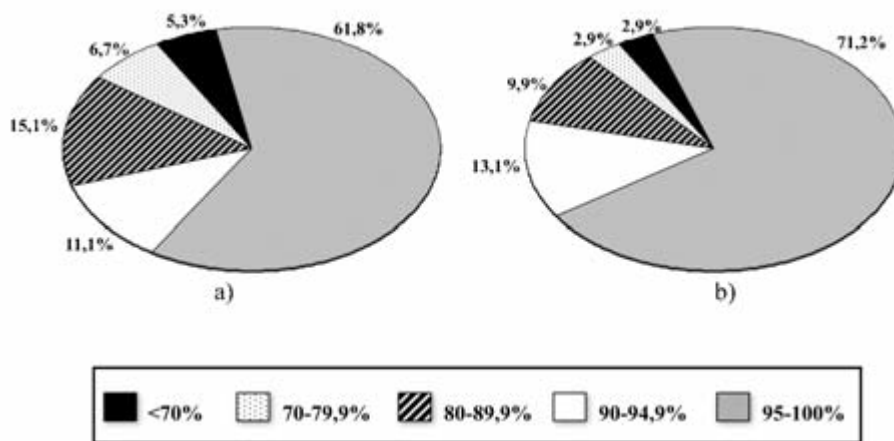


Figura 1. Evolución de la adherencia de los pacientes al tratamiento antirretroviral medida a través de los registros de dispensación. a) Adherencia al tratamiento previa al inicio del Programa de Atención Farmacéutica. b) Adherencia al tratamiento después de un año y medio de la puesta en marcha del Programa de Atención Farmacéutica.

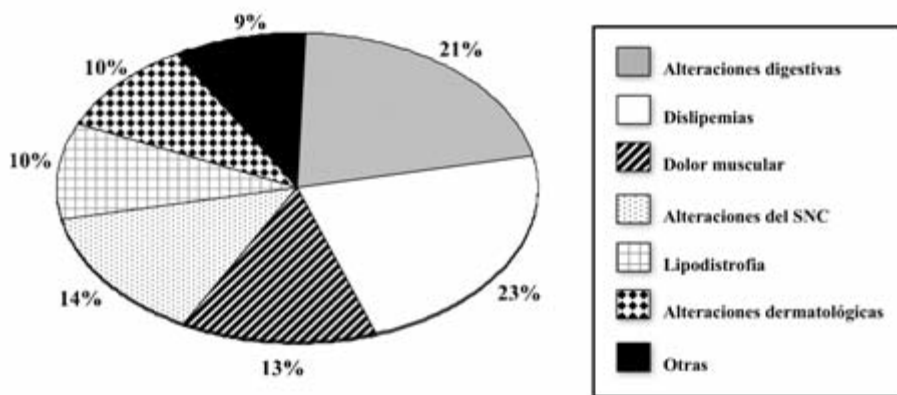


Figura 2. Acontecimientos adversos por medicamentos detectados clasificados de acuerdo a las alteraciones registradas (N = 1.060).

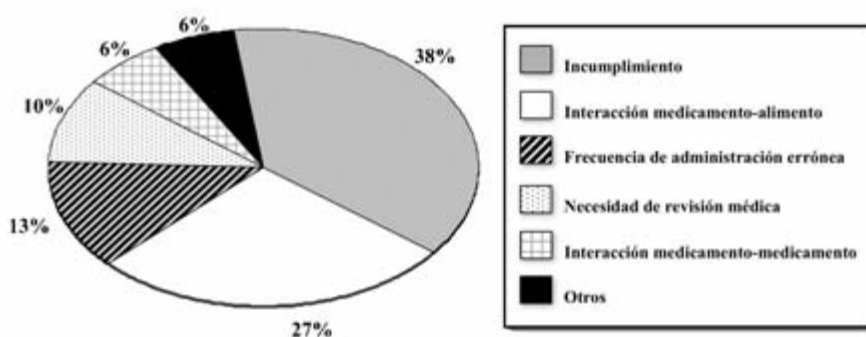


Figura 3. Problemas relacionados con la medicación detectados clasificados de acuerdo a su posible causa (N = 513).

En el periodo evaluado se han identificado 513, PRM, los cuales se representan en la Figura 3 clasificados de acuerdo a sus causas.

3.1.5. Intervenciones farmacéuticas

Desde el inicio del programa de atención farmacéutica se han realizado 1.401 intervenciones en 365 pacientes (94,5% de los entrevistados). En la Figura 4 se muestran, expresadas en forma de porcentaje, las intervenciones realizadas clasificadas de acuerdo al problema que pretendían resolver.

3.1.6. Valoración de las intervenciones relacionadas con PRM o AAM

Un total de 680 intervenciones farmacéuticas relacionadas con PRM o AAM han sido susceptibles de valorarse durante el periodo de instauración del programa. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

3.1.7. Grado de aceptación de los pacientes

El grado de aceptación de los pacientes al servicio de atención farmacéutica es bastante elevado. Éste se calculó mediante una escala subjetiva en la que el entrevistador puntuaba de 0 a 4 en función de la actitud percibida en el paciente. La puntuación media alcanzada durante el periodo evaluado fue de 3,27.

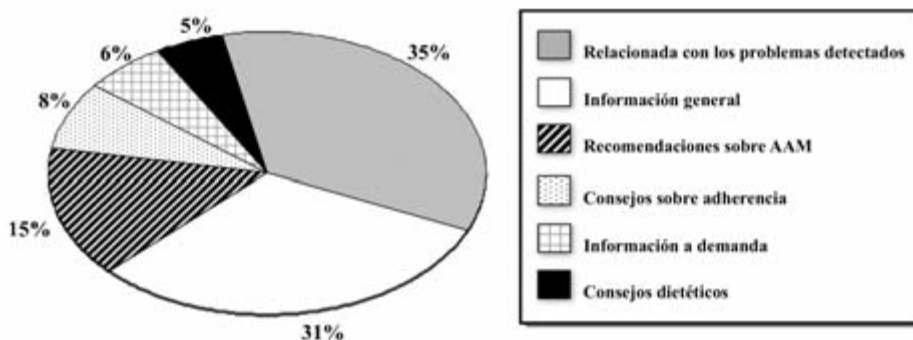


Figura 4. Intervenciones farmacéuticas realizadas clasificadas de acuerdo a su tipo (N = 1.401). AAM: Acontecimientos adversos por medicamentos.

Tabla 1. **Tipos de intervenciones farmacéuticas realizadas y su valoración.**

	Aceptadas	Rechazadas	No valoradas
Necesidad de revisión médica	13	5	35
Interacciones con medicamento	10	6	13
Interacciones con alimentos	43	24	71
Cumplimiento	54	41	103
Mantenimiento de la frecuencia	10	7	19
Recomendaciones sobre AAM	63	28	106
Otros	13	2	14
TOTAL	206	113	361

AAM: Acontecimientos adversos por medicamentos

3.2. Monitorización de niveles plasmáticos de antirretrovirales

El número de pacientes monitorizados es 381, con un total de 1.046 determinaciones de concentración de estos fármacos. Para conseguir una correcta interpretación de los datos obtenidos en la monitorización de antirretrovirales, con objeto de optimizar su posología, se precisa una información complementaria (básicamente relacionada con el horario de toma de la última dosis y de extracción de la muestra, adherencia, medicación concomitante, hábitos alimentarios, etc.), que no siempre pudo ser obtenida; por lo que de las 1.046 determinaciones realizadas, 151 no fueron interpretables por esta causa. También fue preciso descartar un total de 46 determinaciones por haberse realizado la extracción después de ser administrada la medicación en lugar de antes.

De acuerdo con estas consideraciones se incluyeron en el análisis estadístico únicamente los 849 datos de concentración (81,17% de las determinaciones totales) que presentaron una fiabilidad adecuada. La Figura 5 refleja la distribución de las concentraciones plasmáticas de

los antirretrovirales analizados clasificadas de acuerdo a los márgenes terapéuticos actualmente aceptados en la comunidad internacional para los fármacos antirretrovirales estudiados (14).

3.2.1. *Ajustes posológicos*

Durante el periodo evaluado, los clínicos han realizado, basándose en la información farmacocinética disponible de cada individuo, el ajuste posológico en 16 pacientes tratados con atazanavir, efavirenz, nevirapina o nelfinavir.

ATAZANAVIR (ATV)

En cuatro pacientes ha sido preciso reducir las concentraciones plasmáticas de ATV, muy elevadas tras recibir la posología convencional (ATV 300 mg asociado a ritonavir [RTV] 100 mg; ambos una vez al día). Para ello se ha suprimido su asociación con el potenciador (RTV), lo que ha permitido conseguir concentraciones de fármaco dentro del margen terapéutico aceptado. Como consecuencia de esto, se ha observado un claro descenso en los niveles de colesterol, triglicéridos y bilirrubina, efectos adversos característicos de este antirretroviral.

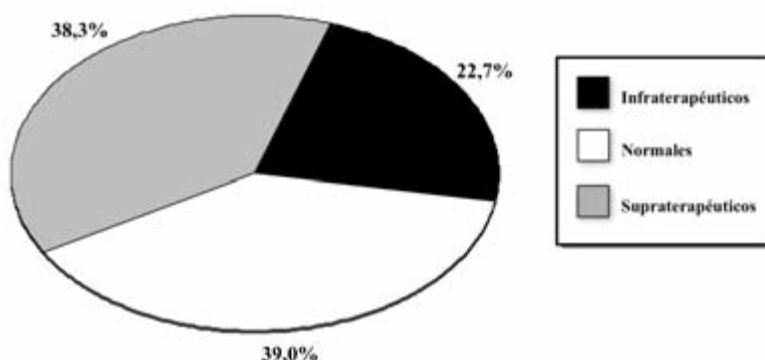


Figura 5. Distribución de las concentraciones plasmáticas de antirretrovirales de acuerdo a sus márgenes terapéuticos (N = 849).

EFAVIRENZ

En cuatro pacientes se ha recurrido a la reducción de las dosis desde 600 a 400 mg (cada 24 horas). Los niveles plasmáticos de fármaco en estos pacientes superaban ampliamente los máximos recomendados; y esta disminución de dosis logró una reducción de los AAM a nivel del sistema nervioso central, sin que se afectara la respuesta clínica de los pacientes. En otros cinco pacientes, fue preciso incrementar la dosis, a 800 ó 1.000 mg/día, debido a que las concentraciones mínimas de equilibrio (C_{\min}^{ss}) estimadas eran cercanas o menores al límite inferior recomendado en la bibliografía (1 mg/l), y por tanto los pacientes se encontraban en riesgo de fracaso virológico (22). Estos ajustes permitieron en todos los casos incrementar la C_{\min}^{ss} y mantener o mejorar la respuesta clínica.

NEVIRAPINA

Fue precisa la corrección posológica en dos pacientes con daño hepático crónico, cuyas concentraciones plasmáticas de nevirapina fueron muy superiores a las recomendadas en la bibliografía. Las disminuciones fueron de 400 mg/día a 300 mg/día en un paciente y a 200 mg/día en el otro. En ambos casos y después de sucesivas analíticas, los parámetros bioquímicos indicadores de daño hepático se acercaron a valores normales.

NELFINAVIR

Se precisó la reducción de la posología de 2.250 a 1.500 mg/día en un paciente que presentaba concentraciones plasmáticas de nelfinavir muy elevadas. Con este nuevo esquema el paciente alcanzó niveles terapéuticos del fármaco manteniendo la eficacia clínica.

4. DISCUSIÓN

El programa de seguimiento de pacientes VIH+ instaurado ha conseguido una disminución de la proporción de pacientes con bajas ta-

sas de adherencia de un 12 a un 6% (medidos según registros de dispensación), y un aumento de la proporción de pacientes con un grado de adherencia óptimo desde el 62% al 71% (Figura 1). El porcentaje de pacientes con adherencia óptima según el cuestionario SMAQ es de un 78%. La diferencia en la estimación a través de ambos métodos obedece a que en el caso de los registros de dispensación la información es más objetiva, ya que se basa exclusivamente en la retirada de la medicación del paciente de la farmacia del hospital durante un cierto periodo; en cambio, en el cuestionario SMAQ, es el propio paciente quien a través de las preguntas realizadas por el farmacéutico reconoce si deja de tomar la medicación ocasionalmente, por lo que en este último caso, es perfectamente posible que el paciente falte a la verdad y supralore su adherencia.

Tal y como se observa en la Figura 2, los AAM detectados son numerosos (un total de 1.060), y de diferente naturaleza, destacando en orden de frecuencia las alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas, etc.) y las dislipemias (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia). Estos AAM son característicos de la medicación antirretroviral. Los primeros suelen disminuir en intensidad después de transcurridas unas semanas desde el inicio de la TAR, mientras que en el segundo caso éstos se mantienen a lo largo del tratamiento, por lo que es necesario estar atentos a su evolución para proponer estrategias de mejora cuando sea necesario (dieta, ejercicio, hipolipemiantes, etc).

La Figura 3 muestra que el principal PRM es la no-adherencia, con un porcentaje del 38%. Le sigue en orden de frecuencia las interacciones con alimentos (27%), debido a que la mayoría de los medicamentos antirretrovirales tienen ciertas restricciones dietéticas que es importante tener presente para favorecer su absorción y en consecuencia su eficacia terapéutica. A lo largo de este tiempo se ha podido verificar que un número importante de pacientes desconocían estas recomendaciones y por tanto es necesario educarles al respecto para optimizar los resultados de su terapia. De hecho, las intervenciones realizadas se basan fundamentalmente en proporcionar información a los pacientes, la cual en un 35% está relacionada con los problemas específicos detectados, un 31% es información general, principalmente con fines educativos en relación a su patología y tratamiento, y un 15% son recomendaciones para disminuir o evitar los

AAM. Además la detección de una tasa importante de pacientes con problemas de adherencia ha dado lugar a actuaciones de educación del paciente sobre este aspecto y a la aplicación de técnicas de refuerzo positivo para mejorarla. Será necesario esperar a los controles sucesivos para confirmar la utilidad de estas intervenciones sobre las pautas de comportamiento de los pacientes.

Tal como se observa en la Tabla 1, un porcentaje importante de las intervenciones farmacéuticas realizadas en los pacientes son aceptadas por ellos (206 v/s 103), es decir, los pacientes llevan a cabo las recomendaciones que se les entregan en la entrevista. El hecho de que exista un gran número de intervenciones aún no valoradas, es decir, que aún no pueden clasificarse como aceptadas o rechazadas, se debe a que todavía no se han realizado las entrevistas posteriores a las intervenciones, y por tanto, se desconoce cuál fue el grado de aceptación a las informaciones y/o sugerencias recomendadas.

En general, el grado de aceptación del programa por parte de los pacientes incluidos en el estudio ha sido muy positivo, observándose mejoras significativas como consecuencia de las diferentes intervenciones realizadas sobre sus esquemas posológicos.

La Figura 5 muestra que sólo el 39 % de las concentraciones plasmáticas de antirretrovirales monitorizados se encuentran dentro de los márgenes terapéuticos recomendados, mientras que el 61% restante presenta valores fuera de dichos márgenes. El número de concentraciones supraterapéuticas resultó ser un 38,3% del total, lo que supone un 62,8% de las concentraciones fuera del margen terapéutico, mientras que sólo un 22,7 % de ellos corresponden a niveles infraterapéuticos, lo que representa el 37,2% de las concentraciones no terapéuticas. Aunque estos resultados son todavía preliminares y deberán ser confirmados en un futuro con un mayor número de pacientes, ya ponen de manifiesto una importante incidencia de infra o sobredosificación que podría corregirse optimizando la posología de acuerdo al comportamiento cinético de estos fármacos. En cualquier caso, es importante estudiar las diferentes causas que pueden motivar un porcentaje tan alto de pacientes con niveles elevados de fármaco (variabilidad en los procesos de liberación, absorción, metabolismo y excreción, que incluyen variabilidad genética, interacciones con otros fármacos administrados de forma concomitante o con ali-

mentos, etc.), y en lo posible, aprovechar la información recogida en las entrevistas de atención farmacéutica, así como la proporcionada por las historias clínicas de los pacientes. Esta información además permitiría establecer posibles correlaciones entre niveles elevados de fármacos y la presencia de AAM, correlación, que de existir, daría un valor añadido a la monitorización de fármacos antirretrovirales.

En resumen, la monitorización de las concentraciones plasmáticas de los antirretrovirales ha permitido:

- Aplicar un método directo para controlar y evaluar la adherencia de los pacientes a la TAR como complemento a los métodos indirectos tradicionalmente utilizados.
- Optimizar los regímenes de dosificación a partir de los parámetros farmacocinéticos estimados para cada paciente con objeto de alcanzar concentraciones de inhibidores de la proteasa e inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos eficaces y seguras.
- Conocer la relación que existe entre las concentraciones plasmáticas de antirretrovirales y los diferentes índices de respuesta clínica, así como con los AAM.

La experiencia de un año y medio de implantación del programa de seguimiento de pacientes VIH+ ha puesto de manifiesto su utilidad para la optimización de la TAR. Se precisa una estrecha colaboración entre los profesionales biosanitarios que, mediante un contacto periódico, permita una evaluación continua de los pacientes con el fin de mejorar su adherencia a los tratamientos y conseguir la administración de dosis óptimas, basadas en el comportamiento cinético del fármaco y en el estado clínico del paciente.

Finalmente destacar que la comunicación del farmacéutico con el resto del equipo asistencial ha sido óptima gracias a la buena disposición de los prescriptores y al enorme interés con el que se intenta atender a sus demandas desde el Servicio de Farmacia. Esto permite disponer, tanto a farmacéuticos como a médicos, de una visión más integral de los pacientes al compartir la información generada por todos. El contacto personal continuado y el cumplimiento de los plazos para generar informes confieren solidez al proyecto.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto FIS PI070714 otorgado por el Ministerio de Sanidad y Consumo de España, en el marco del Plan Nacional de I+D+I 2004-2007.

Todos los principios activos utilizados han sido de grado analítico, gracias a la gentileza de los siguientes laboratorios: atazanavir y efavirenz: Bristol-Myers-Squibb; lopinavir y ritonavir: Abbott; nelfinavir y saquinavir: Roche; indinavir: Merck Sharp & Dhome y nevirapina: Boehringer Ingelheim.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Collazos, J., López, J.C. & Pedrol, E. (2005) VIH y enfermedades asociadas. Barcelona Grupo Ars XXI de Comunicación, SL. Barcelona.
2. Back, D., Gatti, G., Fletcher, C., Garaffo, R., Haubrich, R., Hoetelmans, R., Kurowski, M., Lubner, A., Merry, C. & Perno, C.F. (2002) Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. *AIDS*. 16 Suppl.1: S5-S37.
3. Aarnoutse, R.E., Schapiro, J.M., Boucher, C.A., Hekster, Y.A. & Burger, D.M. (2003) Therapeutic drug monitoring: an aid to optimising response to antiretroviral drugs? *Drugs*. 63: 741-753.
4. Knobel, H., Codina, C., Miró, J.M., Carmona, A., García, B., Antela, A., Gómez-Domingo, M.R., Arrizabalaga, J., Iruin, A., Laguna, F., Jiménez, I., Rubio, R., Lluch, A. & Viciano, P. (2000) Recomendaciones GESIDA/SEFH/PNS para mejorar la adherencia al tratamiento antirretroviral. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 18: 27-39.
5. Comisión de Normas y Procedimientos de la SEFH. Recomendaciones para desarrollar un programa de atención farmacéutica al paciente VIH. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Junio, 2001. Disponible en: http://www.sefh.es/normas/Paciente_VIH.pdf. Revisado: Enero 2008.
6. GESIDA/SEFH/PNS. Recomendaciones GESIDA/SEFH/PNS para mejorar la adherencia al tratamiento antirretroviral. Grupo de estudio de SIDA-SEIMC. Junio, 2008. Disponible en: http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/Gesida_dcycrc2008_adherenciaTAR.pdf. Revisado: Agosto 2008.
7. Knobel, H., Alonso, J., Casado, J.L., Collazos, J., González, J., Ruiz, I., Kindelan, J.M., Carmona, A., Juega, J. & Ocampo, A., Geema Study Group. (2002) Validation of a simplified medication adherence questionnaire in a large cohort of HIV-infected patients: the GEEMA Study. *AIDS*. 16: 605-613.
8. Descamps, D., Flandre, P., Calvez, V., Peytavin, G., Meiffredy, V., Collin, G., Delaugerre, C., Robert-Delmas, S., Bazin, B., Aboulker, J.P., Pialoux, G., Raffi, F. & Brun-Vézinet, F. (2000) Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. Trilège (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072 Study Team). *JAMA*. 283: 205-211.

9. Markowitz, M. (2000) Resistance, fitness, adherence, and potency: mapping the paths to virologic failure. *JAMA*. 283: 250-251.
10. Austin, D., Ferguson, N., Fraser, C. & Roms, K. (1999) Understanding antiretroviral treatment failure: the role of pharmacokinetic/dynamics and patient non-compliance in the emergence of resistance. 7th European Conference on Clinical Aspects and treatment of HIV-infection. Lisboa. October 1999 [abstract 212].
11. Paris, D., Ledergerber, B., Weber, R., Jost, J., Flepp, M., Opravil, M., Ruedf, C. & Zimmerli, S. (1999) Incidence and predictors of virologic failure of antiretroviral triple-drug therapy in a community-based cohort. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 15: 1631-1638.
12. Watson, D.C. & Farley, J.J. (1999) Efficacy of and adherence to highly active antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18: 682-689.
13. San Francisco AIDS Foundation. La terapia de salvamento. Disponible en: http://www.sfaf.org/tratamiento/betaespanol/s52/s52_salvamento.pdf. Revisado: Enero 2008.
14. HIV Pharmacology USA. Updated Guidelines 2006. HIVPharmacology.com Available from: <http://www.hivpharmacology.com>. Cited on July 2008.
15. Aymard, G.; Legrand, M., Trichereau, N. & Diquet, B. (2000) Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 744: 227-240.
16. Colombo, S., Guignard, N., Marzolini, C., Telenti, A., Biollaz, J. & Decosterd, L.A. (2004) Determination of the new HIV-protease inhibitor atazanavir by liquid chromatography after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 810: 25-34.
17. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration (U.S.) Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>. Cited on January 2008.
18. McDougal, J.S., Martin, L.S., Cort, S.P., Mozen, M., Heldebrant, C.M. & Evatt, B.L. (1985) Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special reference to antihemophilic factor. *J. Clin. Invest.* 76: 875-877.
19. Abbottbase Pharmacokinetic Systems. (1991) Abbott Laboratories. Diagnostic Division Abbott Park, Illinois.
20. Leape, L.L., Kabacennell, A. & Berwick, D.M. (1998) Breakthrough Series Guide: Reducing adverse drug events. Institute for Healthcare Improvement, Boston.
21. Panel de Consenso. (2002) Segundo Consenso de Granada sobre Problemas Relacionados con Medicamentos. *Ars. Pharm.* 43: 175-184
22. Marzolini, C., Telenti, A., Decosterd, L.A., Greub, G., Biollaz, J. & Buclin, T. (2001) Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 15: 71-75.

***Información de Contacto:**

Dr. Salvador Cabrera Figueroa.
Servicio de Farmacia, Hospital Universitario de Salamanca.
Paseo de San Vicente 58-182. 37007 Salamanca.
Teléfono: 923-291172. FAX: 923-291174.
Email: farpacex@husa.sacyl.es

El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2008: deshaciendo el nudo gordiano. El premio Nobel de Química 2008: otra herramienta genética al servicio de la ciencia

Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia se reúne en Sesión Científica pública para conmemorar la concesión de los Premios Nobel de Fisiología o Medicina y de Química que tienen que ver con los intereses científicos de nuestra institución.

1. EL PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA O MEDICINA 2008

El 6 de octubre de 2008 la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hacía pública la concesión del Premio Nobel 2008 en Fisiología o Medicina al Dr. Harald zur Hausen (Centro Alemán de Investigación en Cáncer, Heidelberg) “por su descubrimiento de los virus de papiloma humano causantes del cáncer cervical” y a la Dra. Françoise Barré-Sinoussi (Departamento de Virología, Instituto Pasteur, París) y al Dr. Luc Montagnier (Fundación Mundial para la Investigación y Prevención del SIDA, París) por “su descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana”.

1.1. El virus del papiloma humano (HPV) y el cáncer cervical

En relación con el descubrimiento del Dr. zur Hausen cabe destacar cómo sus investigaciones iban contra corriente frente a la opinión mayoritaria de la comunidad científica en la década de los setenta del siglo pasado que atribuía el cáncer cervical –que supone el segundo más frecuente entre los distintos tipos de cáncer que sufren

las mujeres– al virus de tipo herpes simplex. En 1974, zur Hausen publicó su primer intento de encontrar ADN del virus de papiloma humano (HPV) en biopsias de cáncer cervical (1), llegando más tarde a sospechar de la heterogeneidad genética de diversos tipos de virus HPV (2). Sin embargo, fue a principios de la década de los ochenta, cuando el grupo de investigación del Dr. zur Hausen (3, 4) encontró que dos variantes del virus del papiloma humano (las HPV16 y HPV18) estaban presentes en más del 80% de los casos de cáncer cervical. Además, sus investigaciones contribuyeron al conocimiento del mecanismo de la carcinogénesis inducida por el HPV y los factores que predisponen la persistencia viral y la transformación celular. Todo ello ha permitido el desarrollo de vacunas profilácticas que garantizan más de un 95% de protección frente al cáncer cervical producido por los subtipos 16 y 18 del HPV.

Para magnificar la trascendencia de las investigaciones llevadas a cabo por el grupo del Dr. zur Hausen, la nota de prensa de la institución Karolinska señala que más del 5% de todos los cánceres humanos son causados por la infección persistente con virus de papiloma y que la infección con este virus es el de mayor transmisión sexual, afectando al 50-80% de la población. De los más de 100 tipos de HPV conocidos, unos 40 infectan el tracto genital y de ellos 15 suponen un alto riesgo de cáncer cervical para la mujer. El virus del papiloma humano se puede detectar en el 99,7% de mujeres con cáncer cervical histológicamente confirmado, afectando a medio millón de nuevos casos al año en todo el mundo que producen la muerte de 250.000 mujeres cada año.

1.2. El virus de inmunodeficiencia humana: deshaciendo el nudo gordiano

Hace unos años escribía yo un comentario sobre los “Fraudes científicos: Ética de la investigación” en el que recogía las siguientes palabras (5):

“En la década de los ochenta del siglo pasado, fue muy notable la controversia establecida entre el Dr. Robert Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer en Bethesda, USA, y el Dr. Luc Montagnier, del Instituto Pasteur de París, sobre la paternidad de la identificación del virus responsable del SIDA (el HIV, por *Human Immunodeficiency*

Virus). Finalmente, Gallo reconoció que ‘probablemente’ algunos cultivos de su laboratorio se habían contaminado con una muestra viral enviada por el Dr. Montagnier. Aunque en 1987 llegaron ambos científicos al acuerdo de repartirse en un 50% la gloria del descubrimiento, es muy posible que la situación creada haga inviable la posibilidad de que reciban el Premio Nobel que el descubrimiento bien merecía”.

Afortunadamente me equivoqué porque la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska ha roto el nudo gordiano de forma muy diplomática acogiéndose a las normas institucionales que, de no tratarse de un premio otorgado a un colectivo, impiden galardonar con el premio a más de tres personas en el mismo año. Así, al otorgar la mitad del premio al Dr. zur Hausen por su investigación en los virus del poliovirus causantes del cáncer de cuello de útero y la otra mitad simultáneamente a los doctores Barré-Sinoussi y Montagnier por su investigación sobre el virus de la inmunodeficiencia humana ya no cabía el Dr. Robert Gallo.

En 1981 se describió en California y Nueva York un nuevo y preocupante síndrome que presentaban grupos de hombres jóvenes que previamente habían estado sanos y cuyos síntomas clínicos no se habían encontrado previamente en dicha población. En 1982, un grupo de trabajo dirigido por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC Task Force) definió la nueva enfermedad como “síndrome de deficiencia inmune adquirida” (AIDS) (6). Posteriormente el CDC concluyó que el AIDS se extendía globalmente especialmente en poblaciones de homosexuales y de consumidores de drogas por vía intravenosa, pero que también se daban casos entre heterosexuales, hemofílicos e inmigrantes procedentes de Haití. La inmunodeficiencia se asoció con la rápida eliminación de células T CD4⁺ y de células presentadoras de antígeno. Como evidencia de la eficacia de la investigación científica y clínica, en dos años se logró identificar la causa del AIDS.

Volviendo a la controversia sobre la exclusión del Dr. Gallo del Premio Nobel, el nudo gordiano científico no se rompió de un tajo de espada como dice la leyenda que Alejandro Magno hizo con el nudo del rey Gordias de Frigia, sino deshaciéndolo con paciencia, siguiendo paso a paso, cronológicamente, todas las investigaciones. Para justificar de alguna manera, si cabe, el desengaño que habrá sufrido sin duda el Dr. Robert Gallo al verse excluido del galardón, en la extensa exposición

científica que hace del descubrimiento la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska dice muy claramente que en 1983 Barré-Sinoussi y Montagnier concluyeron que habían descubierto un nuevo retrovirus humano no-transformante que contenía una proteína principal p25 (7), similar a la del virus HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus*) que en 1981 y 1983 había descubierto el grupo de Gallo (8, 9), pero con diferentes propiedades antigénicas. Este nuevo tipo de virus fue denominado “virus asociado con linfadenopatía (LAV)”. Más tarde, en 1984, Barré-Sinoussi y Montagnier aislaban en dos hermanos con hemofilia B tratados con factor VIII otros virus similares al LAV que denominaron “virus asociados con la inmunodeficiencia” (IDAV-1, IDAV-2) que presentaban una morfología típica de lentivirus tipo D (con un espacio interno cónico-cilíndrico claramente distinto del espacio interno esférico de los virus HTLV-I y HTLV-II) y una proteína p25 idéntica a la de LAV (10). En 1984, Gallo y colaboradores (11-14) describían un nuevo tipo de virus semejante a los HTLV que compartía algunas propiedades con los HTLV-1 y HTLV-2, denominándolo HTLV-III que, sin embargo, presentaba mucha similitud con el LAV-1 de Barré-Sinoussi y Montagnier. Posteriormente, el grupo del Dr. Levy en San Francisco identificó en pacientes con SIDA y con linfadenopatía otro retrovirus del tipo D, del grupo lentivirus, estructuralmente relacionado con el LAV-1 y el HTLV-III (15). Finalmente, los grupos americanos y francés se pusieron de acuerdo en que LAV-1/IADV-1/HTLV-III y ARV eran el mismo tipo de virus, de manera que en 1985 un consorcio internacional de taxonomía viral decidió la denominación definitiva de “virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)” (16-18). ¿Cómo habría que interpretar el hecho de que Gallo reconociera que “probablemente” algunos cultivos de su laboratorio se habían contaminado con una muestra viral enviada por el Dr. Montagnier, tal como recogía al principio de este escrito?

Apropiaciones indebidas en el ámbito científico las ha habido siempre en cualquier disciplina. Podríamos recordar, en el ámbito de los Premios Nobel, la controversia surgida en torno a James D. Watson y Francis H. C. Crick en relación con la forma en que conocieron los datos de Rosalind Franklin sobre la difracción por rayos X de la molécula de ADN que les permitió ganar la carrera del modelo estructural del ADN.

En 1962, Watson y Crick recibieron, junto a Maurice H.F. Wilkins, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por sus descubrimientos

en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva". El artículo original de Watson y Crick de 1953 apareció "escoltado" por dos trabajos sobre modelos de difracción por rayos X realizados por Wilkins y colaboradores y por Rosalind E. Franklin. Watson tenía 25 años cuando se publicó el modelo estructural. Desgraciadamente, Rosalind Franklin, que sin duda alguna hubiera sido merecedora también del premio, había fallecido en 1958 de cáncer de ovario, a los 37 años de edad.

En el libro "*La doble hélice*" escrito por Watson (19), el autor narra de forma autobiográfica sus experiencias vitales en torno al descubrimiento de la estructura del ADN, poniendo de manifiesto las intrigas, insidias y los manejos poco limpios del mundo científico. En esta obra se pueden encontrar, junto a páginas y hechos estimulantes, situaciones en las que la competitividad puede llevar a comportamientos no éticos. La cuestión ética que se plantea en relación con el descubrimiento de la doble hélice tiene que ver con el papel que jugó Rosalind Franklin en el descubrimiento del modelo. Watson y Crick tuvieron acceso, sin el conocimiento y autorización de Rosalind Franklin, de una fotografía que había obtenido ella sobre el modelo de difracción con rayos X del ADN que resultó clave para que aquellos pudieran proponer su modelo estructural de la doble hélice.

Watson y Crick realizaron su trabajo en el Cavendish Laboratory de Cambridge, mientras que Wilkins y Franklin lo llevaron a cabo en el King's College de Londres, donde uno de los edificios lleva el nombre "Franklin-Wilkins". Como dice su biógrafa Brenda Maddox (20), Rosalind Franklin nunca pudo imaginar que se dedicara en su honor un edificio en el King's Collage, donde pasó los dos años más desgraciados de su carrera profesional. Por otro lado, como recuerdo y homenaje a esta científica se ha creado la *Medalla Rosalind Franklin* para premiar a investigadoras del Reino Unido, en un intento de restañar las heridas del pasado. Rosalind Franklin se ha convertido en un icono feminista de la investigación.

De forma anecdótica, en este contexto me viene a la memoria el caso de la variedad de trigo española "Dimas" que, al parecer, fue producto de una "distracción" de semillas de la variedad francesa "Etoile de Choisy". Para mayor sarcasmo, el nombre de la variedad españo-

la responde al del “buen ladrón” del relato evangélico de la crucifixión. Cuando se discute acaloradamente sobre si “patentes, sí” o “patentes, no”, hay que tener presente que las patentes protegen los derechos legítimos de los investigadores y los centros de investigación públicos o privados.

2. EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2008: UNA HERRAMIENTA GENÉTICA AL SERVICIO DE LA CIENCIA

El 8 de octubre, la Real Academia Sueca de Ciencias comunicaba su decisión de otorgar el Premio Nobel en Química 2008 conjuntamente a los doctores Osamu Shimomura (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, y Boston University Medical School, USA), Martin Chalfie (Columbia University, New York, USA) y Roger Y. Tsien (University of California, San Diego, La Jolla, USA) por “el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”.

2.1. La importancia de la herramienta

Como tuve ocasión de recordar en mi discurso de ingreso en esta Real Academia al analizar el desarrollo de la Genética desde la perspectiva de los premios Nobel concedidos a lo largo de la historia de la institución Nobel (21), la regla de oro de la investigación se sustenta en tres apoyos: la pregunta importante que se trata de responder, en qué material biológico y con qué técnicas se puede abordar la investigación. El premio Nobel concedido a Shimomura, Chalfie y Tsien se enmarca dentro de este último apartado: la proteína fluorescente verde (GFP) ha resultado ser una herramienta poderosísima en la investigación genética. Como decía la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, la GFP descrita por vez primera en 1962 por el Dr. Shimomura (22) en la medusa *Aequorea victoria* ha llegado a ser uno de los instrumentos más importantes de la investigación en biociencia actual porque “permite el análisis a nivel molecular de los procesos espacio-temporales intra- e intercelulares que definen el comportamiento dinámico de todos los sistemas vivientes” (23) (Ehrenberg, 2008). Aunque el trabajo inicial de Shimomura estaba enfocado hacia la proteína responsable de la bioluminiscencia de la

medusa que denominó *aequorina*, sin embargo mencionaban también en su trabajo que habían aislado otra proteína que era ligeramente verdosa a la luz del sol, amarillenta bajo luz incandescente y verde fluorescente bajo luz ultravioleta. En un principio la llamaron “proteína verde” a secas; la denominación de “proteína fluorescente verde” fue posterior. Más adelante, Shimomura demostró que la GFP -que es una proteína de 238 aminoácidos- contiene un cromóforo especial que al ser excitado por la luz azul o la luz ultravioleta emite luz en la longitud de onda verde. Esto explica que en la medusa *Aequora victoria* el cromóforo de la GFP simplemente transforma la luz azul de la proteína *aequorina* en luz verde. Pero lo más importante del caso es que, a diferencia del comportamiento de la *aequorina* y otras proteínas bioluminiscentes que necesitan el suministro continuo de moléculas ricas en energía, a la GFP le basta con la luz UV o la luz azul para fluorecer. Cuando la luz entra en las células y encuentra a la GFP se produce la fluorescencia verde sin necesidad de tener que introducir en la célula producto químico alguno que pudiera disturbar los procesos que ocurren en su interior. Shimomura (24) clarificó la estructura química del cromóforo de la GFP que está formado por los aminoácidos de las posiciones 65, 66 y 67 (Ser-Tyr-Gly) que reaccionan químicamente entre sí para formar el cromóforo fluorescente que resulta ser la p-hidroxibenciliden-imidazolinona que tiene su máximo de excitación a 400 nm y el máximo de emisión a los 505 nm.

El anuncio del galardón Nobel justificaba el premio “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”. Efectivamente, Shimomura descubrió la GFP, pero casi treinta años después los doctores Martin Chalfie y Roger Y. Tsien desarrollaron su aplicación como herramienta genética que permite visualizar procesos hasta ahora invisibles al ojo humano. Hoy día la GFP se ha entendido a otras formas procedentes de diferentes organismos y variantes genéticamente manipuladas que constituyen las proteínas de la “familia GFP” que permiten monitorizar los más variados procesos de las células y organismos vivos como son, entre otros, la expresión génica, la localización y dinámica de las proteínas, las interacciones proteína-proteína, la división celular, la organización y replicación cromosómicas, las rutas de transporte intracelular y la biogénesis y transmisión de orgánulos.

Fue en 1988 cuando Chalfie oyó hablar por vez primera de la GFP en un seminario sobre organismos bioluminescentes que tuvo lugar en

la Columbia University, cayendo en la cuenta de que la GFP podía ser de gran utilidad en sus estudios con el nematodo *Caenorhabditis elegans* que había iniciado en su estancia postdoctoral en el laboratorio de Sydney Brenner, premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002. La idea de Chalfie era conectar el gen de la GFP con genes reguladores o con genes que codifican para otras proteínas. Para ello utilizó el gen *gfp* aislado en 1992 por Prasher y colaboradores (25) y al clonarlo en *Escherichia coli* le permitió demostrar que la GFP no necesitaba de otras proteínas para producir el cromóforo. Posteriormente, Chalfie y colaboradores (26, 27) lograron unir el gen de la GFP al promotor de un gen que es activo en seis neuronas de receptores de contacto de *C. elegans*. Lo importante es que, cuando el gen de la GFP se une al de otra proteína que se quiere estudiar en algún organismo, dicha proteína no pierde su actividad normal a la vez que la GFP mantiene su fluorescencia, de manera que se puede seguir la localización, movimiento e interacciones de la proteína dentro del organismo mediante monitorización con el microscopio.

A partir de aquí es cuando entra en escena el Dr. Tsien cuyo mérito indudable ha sido el de ampliar la “paleta de colores” disponible para el investigador mejorando, además, la intensidad y duración de su brillo. Tsien y colaboradores (28) estudiaron cómo la formación del cromóforo fluorescente en la GFP ocurre postraduccionalmente con el oxígeno molecular como único factor auxiliar. Asimismo, manipulando el ADN del gen GFP, el grupo de Tsien obtuvo nuevas variantes de GFP que aumentaban la intensidad del brillo y producían la aparición de nuevos colores (azul, amarillo, etc.) (29-31), destacando también sus importantes contribuciones para lograr el desarrollo de variantes de las proteínas fluorescentes rojas a partir de la “proteína fluorescente DsRed” procedente del coral *Discosoma* (32). (Para revisiones sobre el trabajo de Tsien y colaboradores ver 33-35). Como decía un comentarista de la institución Nobel, “46 años después de que Shimamura publicara su trabajo sobre la GFP, hay un caleidoscopio de proteínas “GFP-like” que brillan con todos los colores del arco iris”.

Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, “los investigadores pueden analizar el daño de las células nerviosas en la enfermedad de Alzheimer o cómo se originan las células beta productoras de insulina en el páncreas durante el desarrollo del embrión o las células nerviosas del cerebro”. Aplicaciones espec-

taculares de estas técnicas son, por ejemplo, el denominado “cerebro-arco iris” (*brainbow*) de ratones genéticamente modificados que producen distintas coloraciones (amarillo, azul oscuro y rojo) en las células nerviosas del cerebro, lo cual permite seguir la pista de la fibras nerviosas desde células individuales en la intrincada red cerebral.

Por mi afición a relacionar los dichos y refranes con la Genética (36), permítaseme en este contexto académico hacer referencia al conocido dicho “dígaselo con flores” que puede ser parafraseado por el de “dígaselo con genes”, teniendo en cuenta la aplicación de las técnicas de ingeniería genética molecular que permiten modificar los colores naturales de las flores (por ejemplo, la obtención de rosas azules) o cuando se utiliza la expresión “es más raro que un perro verde” que hoy, con la manipulación genética del gen de la proteína fluorescente verde no nos causaría extrañeza si recordamos que ya estamos acostumbrados a ver “ratones verdes” en el laboratorio. Además, al tener en cuenta cómo la GFP hace visibles a las proteínas a las que se une tras la manipulación genética, me viene a la memoria el dicho “dime con quién andas y te diré quién eres”.

Finalmente hay que señalar la posible aplicación biotecnológica de la GFP como es su utilización como sensores de arsénico y metales pesados. Por ejemplo, se han obtenido bacterias genéticamente modificadas resistentes al arsénico que fluorescen en verde en su presencia y otros organismos que permiten detectar la presencia de cinc y cadmio o incluso explosivos (TNT).

3. EPÍLOGO

Hoy, en 2008 como sucediera en años anteriores, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 36 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 78 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 36 premios considerados, 28 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 7 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 78 científicos galardonados, 62 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 15 de Química y 1 de la Paz. Por cierto que, de estos 78 científicos, ¡solamente 4 de ellos son mujeres!: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995), Linda S. Buck (2004) y Françoise Barré-Sinoussi (2008), lo

cual supone un poco más del 5%. En 2007 tuve la oportunidad de hacer una actualización de la historia “nobelada” de la Genética que, como se ha mencionado anteriormente, fue mi discurso de ingreso en esta Real Academia (37).

Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de década se ha premiado la investigación genética en ocho ocasiones: 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”), 2004 (Axel y Buck, “por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo”), 2006 (Fire y Mello, “por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena”), 2006 (Kornberg, “por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica”), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, “por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias”), 2008 (zur Hausen, “por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”; Barré-Sinoussi y Montagnier, “por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana”) y 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP”). Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética.

Finalmente, si se me permite hacer alguna profecía, yo me atrevo a sugerir que, antes o después, los grandes pioneros de la Genómica (¿Venter, Collins?) y la reprogramación celular (¿Wilmut, Yamanaka, Thomson?) serán galardonados con el premio Nobel. ¡Ojalá tengamos ocasión de recordar estas palabras mías en una ulterior sesión científica de esta Real Academia Nacional de Farmacia!

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. & Bornkamm, G.W. (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*. 13: 650-656.
2. Gissmann, L. & zur Hausen, H. (1976) Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *PNAS*. 73: 1310-1313.

3. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*. 80: 560-563.
4. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. & zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsias and in cell derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151-1157.
5. Lacadena, J.R. (2006) Fraudes científicos: Ética de la investigación, *Pági-ina web "Genética y Bioética", Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa (CNICE), MEC*, <http://w3.cnice.mec.es/tematicas/genetica>
6. Cdc Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections (1982) Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.* 306: 248-252.
7. Barré-Sinoussi, F., Cherman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-871.
8. Rho, H.M., PoiesZ, B., Ruscetti, F.W. & Gallo, R.C. (1981) Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology*. 112: 355-360.
9. Gallo, R.C., Popovic, M., et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 865-867.
10. Vilmer, E., Barré-Sinoussi, F., Rouzioux, C., Gazengel, C., Brun, F.V., Dauguet, C., Fischer, A., Manigne, P., Cherman, J.C., Griscelli, C. & Montagnier, L. (1984) Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet*. 1: 753-757.
11. Popovic, M., Sarnghadharan, M.G., Read, E. & Gallo, R.C. (1984) detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224: 497-500.
12. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, N., et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500-503.
13. Schüpbach, J., Popovic, M., Gilden, R.V., Gonda, M.A., Sarnghadharan, M.G. & Gallo, R.C. (1984) Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*. 224: 503-505.
14. Sarnghadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. & Gallo, R.C. (1984) Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*. 224: 506-508.
15. Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuru, J.M. & Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225: 840-842.
16. Wain-Hobson, S., Alizon, M. & Montagnier, L. (1985) Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature*. 313: 743.
17. Ratner, L., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. (1985) HTKV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature*. 313: 636-637.
18. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Temin, H.M. & Varmus, H.J. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature*. 321: 10-12.

19. Watson, J.D. (1968) The double helix. Weidenfeld and Nicolson, London, (traducido al español con el título "La doble hélice").
20. Maddox, B. (2003) The double helix and the "wronged heroine". *Nature*. 421: 407-408.
21. Lacadena, J.R. (1995) Historia "nobelada" de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 7-76.
22. Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-229.
23. Ehrenberg, M. (2008) The green fluorescent protein: discovery, expression and development. Information Department, The Royal Swedish Academy of Sciences.
24. Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letter*. 104: 220-222.
25. Prasher, D., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Pendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*. 111: 229-233.
26. Chalfie, M. et al. (1993) A new method of looking at *C. elegans* gene expression. *Worm Breeder's Gazette*, 13 (1) (October 1).
27. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.
28. Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 12501-12504.
29. Heim, R., Cubitt, A. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*. 373: 663-664.
30. Heim, R. & Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6: 178-182.
31. Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.
32. Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K. & Tsien, R.Y. (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 11990-11995.
33. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 22: 1562-1572.
34. Shaner, N.C., Patterson, G.H. & Davidson, M.W. (2007) Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* 120: 4247-4260.
35. Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. & Tsien, R.Y. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods*. 5: 545-551.
36. Lacadena, J.R. (2003) Dichos, refranes y Genética. Lección Inaugural del Curso Académico 2003/2004, Universidad Complutense.
37. Lacadena, J.R. (2007) Conmemorando los 100 años del término "Genética" (1905-2005): Una historia "nobelada" de la Genética. Conferencia plenaria, Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería, 2005. Universidad de León.

Un Nobel esperado: descubrimiento de los agentes causales del SIDA y cáncer cervical

Mariano Esteban Rodríguez

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Profesor de Investigación del CSIC y Jefe del grupo de Poxvirus y Vacunas del Centro Nacional de Biotecnología

Han tenido que transcurrir 25 años para que el mundo recibiera la noticia de la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a los investigadores que descubrieron a los agentes causales del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y del cáncer cervical. La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo anunció el día 6 de octubre de 2008 la concesión de tan alto galardón conjuntamente a los investigadores franceses Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi por el descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como agente causal del SIDA y al científico alemán Harald zur Hausen por identificar el virus del papiloma como responsable del cáncer cervical. Como reconoció Montagnier cuando recibió la llamada telefónica de la concesión del Nóbel mientras se encontraba asistiendo a una reunión en la República de Costa de Marfil *“Agradezco que el Comité Nobel ha puesto en antena esta epidemia que no se ha acabado y mi mensaje es que debemos de continuar la investigación... completar los tratamientos en pacientes... y mientras tanto desarrollar vacunas... con la finalidad de que las personas infectadas no enfermen”*. Por su parte el mensaje de Barré-Sinoussi ha sido *“el éxito de haber descubierto el virus del SIDA ha sido trabajar con un equipo mundial con gran experiencia... es importante en el futuro, cuando se trabaja con enfermedades, el colaborar con un equipo de clínicos, virólogos y microbiólogos, en hospitales y en ciencias básicas. Esto fue realmente esencial para el descubrimiento del virus del SIDA”*. El investigador zur Hausen destacó lo siguiente *“pudimos demostrar que hay una pluralidad de tipos del virus del papiloma humano... pero nos concentramos en aislar el virus de verrugas genitales ya que supusimos que el virus era la causa del desarrollo del cáncer cervical... que finalmente demostramos*

en 1983. Pienso que la vacunación es muy exitosa, pero la desventaja es su alto coste en los lugares del mundo mas necesitados”.

La Asamblea Nobel en su resumen destacó el por qué de la concesión a los dos grupos de científicos:

Francoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier demostraron la existencia del VIH en linfocitos de pacientes con nódulos linfáticos inflamados a tiempos tempranos en la infección y también en la sangre de pacientes en los estadios tardíos de la infección (1). Los investigadores caracterizaron el retrovirus como el primer lentivirus humano basado en su morfología, y en propiedades bioquímicas e inmunológicas. Además, observaron que el VIH inactivaba el sistema inmune debido a una replicación masiva del virus con la consiguiente destrucción de los linfocitos. El descubrimiento del VIH fue un prerequisite para el posterior entendimiento de la biología de la enfermedad y el tratamiento con antirretrovirales.

Harald zur Hausen fue contra el dogma que predominaba en la década de 1970 y postuló que el virus del papiloma humano (VPH) con capacidad oncogénica causaba el cáncer cervical, el segundo mayor cáncer entre las mujeres. Demostró que el DNA del VPH podía existir en los tumores en un estadio no productivo y podía ser detectado con secuencias específicas de DNA. Observó que el VPH representaba a una familia heterogénea de virus y sólo algunos tipos causaban cáncer. Este descubrimiento permitió la caracterización de la historia natural de la infección por VPH y el entendimiento de los mecanismos de la inducción carcinogénica por VPH y el desarrollo de vacunas profilácticas contra la adquisición de VPH (2, 3).

El descubrimiento de los agentes causales de los virus VIH y VPH no se entendería sin hacer un breve resumen de la biografía de los científicos involucrados.

Luc Montagnier, tiene 76 años, obtuvo el doctorado en virología por la Universidad de París, y actualmente es Profesor Emérito y Director de la World Foundation for AIDS Research and Prevention en París. Durante muchos años el interés científico de Montagnier fue demostrar la relación entre virus y cáncer. Estos estudios los inició durante su estancia en el reino Unido, y a su regreso a Francia creó la Unidad de Virología del Cáncer. Consideró que los retrovirus podían tener re-

Montagnier

Barré-Sinoussi

zur Hausen



Figura 1. Los descubridores de los agentes causales del Sida (Montagnier y Barré-Sinoussi) y del cáncer cervical (zur Hausen).

lación directa con el cáncer y aunque estas investigaciones no dieron su fruto, sin embargo los conocimientos adquiridos sobre los interferones y cultivos celulares le sirvieron de referente para abordar el aislamiento del primer lentivirus humano cuando a principios de la década de 1980 aparece el SIDA y su laboratorio se lanza a la búsqueda del agente causal.

Francoise Barré-Sinoussi, de 61 años, obtuvo el doctorado en virología en el Instituto Pasteur de París. Es Profesor y Director de la Unidad de Regulación e Infecciones Retrovirales en dicho Instituto. Su colaboración con el grupo de Montagnier fue vital para el descubrimiento del VIH gracias a su experiencia sobre retrovirus.

Harald zur Hausen, tiene 72 años, obtuvo el título de doctor en Medicina por la Universidad de Düsseldorf en Alemania. Es Profesor Emérito y anterior Jefe del Departamento y Director Científico del German Cancer Research Centre en Heidelberg. En una época, ini-

cios de los años 1970, en la que la gran mayoría de los científicos creían que había una relación causa-efecto entre herpesvirus y cáncer cervical, zur Hausen aportó las primeras pruebas en contra del dogma. Su interés por el virus del papiloma humano le llevó a identificar varios tipos de virus y demostrar que había una relación directa entre el virus del papiloma y cáncer.

Indudablemente fue la mentalidad y determinación la que llevó a estos tres científicos a demostrar que el VIH y el VPH eran dos agentes infectivos con capacidad para producir alta tasas de mortandad, sobre todo en el caso del VIH y ciertos tipos de cáncer. Analicemos cómo estos investigadores llegaron a identificar a los agentes causales del SIDA y del cáncer cervical. Examinemos primero cómo se forjó el descubrimiento del VIH.

1. DESCUBRIMIENTO DEL VIH

Como anécdota mencionaré que en 1981 coincidiendo con mi estancia como Profesor del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina en la Universidad del Estado de Nueva York (SUNY) y colaborando con el Dr Joseph Sonnabend, un científico que además de Profesor de SUNY hacía asistencia clínica en el Lower East de Manhattan, nos llegó la noticia de que un grupo en los Ángeles había detectado una neumonía en pacientes homosexuales que estaban afectados con *Pneumocytis carinii* y que les producía una fuerte depleción de las células T de defensa inmunitaria (4). Como el Dr Sonnabend trataba pacientes homosexuales y su experiencia científica era en virología y en los interferones como agentes antivirales, consideraba que la causa probable de la infección era un herpesvirus como el citomegalovirus. Mi laboratorio trabajaba entonces sobre el mecanismo de acción de los interferones, por lo que no entré en la investigación sobre el VIH hasta finales de la década de 1980 con la búsqueda de una vacuna (5). Los estudios iniciales indicaban claramente que la enfermedad tenía una etiología infectiva, probablemente un virus, y que era transmitida por vía sexual y por la sangre. En esos tiempos, entre 1981/82 se hacían conjeturas, pero eran pocos los laboratorios que podían abordar la búsqueda del agente causal. Se necesitaba un gran equipo de profesionales en enfermedades infecciosas, científicos básicos, clínicos y epidemiólogos. En esos años se había descubierto por

el equipo del Dr Robert Gallo del NIH el primer retrovirus humano que infectaba células T (HTLV-I) así como también se conocía el virus que producía una inmunodeficiencia severa en los gatos (FeLV), por lo que parecía plausible que el agente causal de la inmunodeficiencia observada fuera un retrovirus. Fue en 1982 cuando el grupo francés en la Unidad de Oncología Viral del Instituto Pasteur, liderado por Luc Montagnier junto con el grupo de Jean-Claude Chermann en el que se encontraba la joven científica Françoise Barré-Sinoussi, que abordó la aventura de identificar el agente causal con la hipótesis de poder ser un retrovirus humano. La primera muestra biológica que el grupo recibió fue en enero de 1982 consistente en una biopsia procedente de un nódulo linfático de un individuo con linfadenopatía severa. El trabajo se repartió entre los miembros del equipo. La experiencia de Montagnier en cultivos celulares e interferones fue crucial para poner en cultivo células de nódulos linfáticos y poder seguir durante su crecimiento la presencia de retrovirus midiendo la actividad transcriptasa reversa (RT). Aquí fue clave la experiencia de Françoise Barré-Sinoussi que era experta en retrovirus, por lo que midiendo la actividad RT en los sobrenadantes de las células en cultivo pudo demostrar que efectivamente estaban infectadas con retrovirus. Como quiera que las células terminaban muriéndose, decidieron añadir células mononucleares de sangre periférica (PBLs) de individuos sanos y observar que la actividad RT se mantenía durante más tiempo en los cultivos a la vez que las células se morían. Al analizar estas células infectadas al microscopio electrónico observaron partículas virales saliendo de la membrana plasmática celular.

Recuerdo que estas imágenes que Luc Montagnier presentó en un meeting en Cold Spring Harbor fueron recibidas con escepticismo por considerar más una contaminación con retrovirus, aunque su morfología era claramente diferente a la de otros retrovirus humanos conocidos. Mediante microscopía de fluorescencia determinaron que el suero de pacientes infectados contenía anticuerpos específicos frente a las células de dichos pacientes. Sin embargo el suero de pacientes infectados con el retrovirus humano entonces conocido HTLV-I (presente en linfocitos T de pacientes con linfomas y leucemias) no era capaz de reaccionar con las células de los pacientes del grupo de Montagnier. La especificidad del suero de pacientes fue también demostrada en experimentos de inmunoprecipitación de extractos celulares y de par-

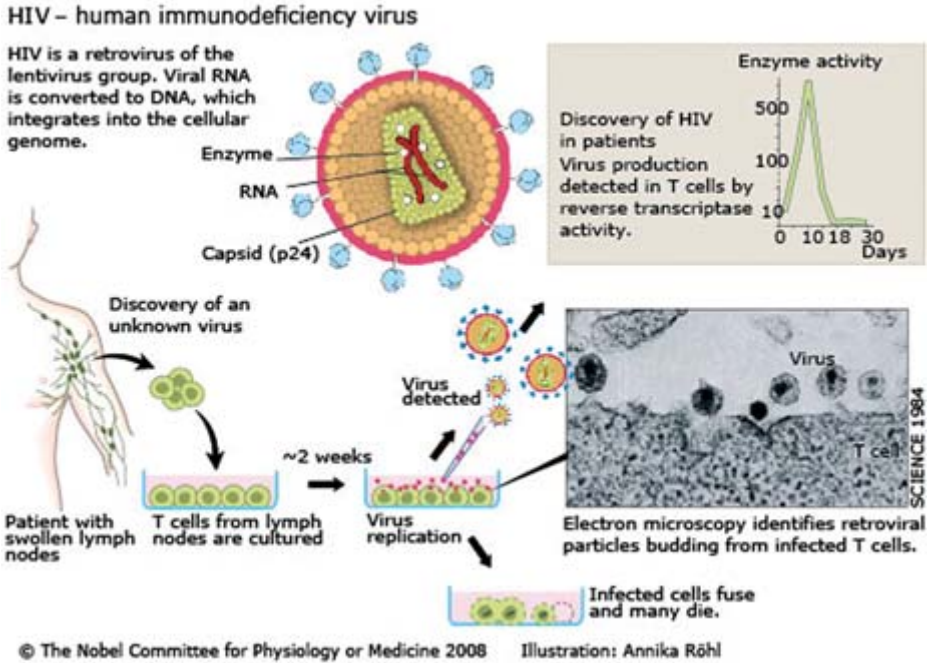


Figura 2. Esquema de la Academia sueca sobre el descubrimiento del VIH por el equipo francés galardonado con el Nobel.

tículas virales liberadas en los sobrenadantes. Los resultados obtenidos por el grupo francés, con la descripción inicial del virus causante de Sida y que bautizaron con el nombre de virus asociado a linfadenopatía (LAV) fueron publicados por la revista Science en mayo de 1983 (1). El virus fue posteriormente descubierto por el grupo de Gallo con el nombre de HTLV-III (6) y por el grupo de Levy con el nombre de AIDS-associated retrovirus (7). Años después y por consenso de la comunidad científica el virus causante del Sida recibiría el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (8).

Entre 1983-1985 se produce un aluvión de publicaciones sobre el tema, muchos trabajos fruto de colaboraciones entre científicos y clínicos, destacando la contribución del grupo de Gallo (6, 9), que refuerzan las conclusiones del grupo francés. Se demuestra que los individuos con riesgo de Sida y los que ya tienen la enfermedad

contienen anticuerpos específicos frente al retrovirus de la inmunodeficiencia humana, confirmando al virus como causante del Sida. También se confirma que el virus tiene tropismo específico por las células T CD4+ causando su muerte. Es en 1985 cuando se secuencian el genoma viral de unos 10.000 nucleótidos y se define al retrovirus como un lentivirus de alta complejidad genética (10).

2. LA POLÉMICA DEL DESCUBRIMIENTO CON EL INVESTIGADOR GALLO

Aunque en la comunicación oficial del Instituto Karolinska no se hace referencia al investigador americano Robert Gallo, en la información ampliada sobre los precedentes del hallazgo y su trascendencia se cita al virólogo estadounidense junto con “otros grupos de investigación” por sus trabajos clave sobre retrovirus. Durante años la paternidad del descubrimiento del VIH se consideró compartida entre Montagnier y Gallo, hasta que se demostró que el laboratorio americano, con o sin su consentimiento, había presentado como propio el patógeno aislado por el equipo francés. Barré-Sinoussi manifestó al recibir la comunicación de la noticia del Nobel que *“es un conflicto a olvidar. Además los equipos americanos fueron importantes en el descubrimiento del virus, y eso debe ser reconocido”*. Para los que han dado el galardón *“no había duda acerca de quien hizo el descubrimiento fundamental”* como lo expresó el miembro de la Asamblea Nobel, María Maucci. Por su parte el Director del NIAID del NIH, Anthony Fauci reconoció que hubiera sido justo el haber concedido el galardón a Gallo, pero que entendía que como el Nobel sólo se puede conceder a tres personas, la cuarta quedaba fuera y los franceses fueron los primeros en aislar el virus del Sida. Es indiscutible la contribución muy importante del grupo de Gallo en demostrar que el virus es causante del Sida, así como en el entendimiento de la genética y biología del VIH. En sus declaraciones a la prensa Gallo manifestó *“estar desilusionado con no haber sido incluido en el Nobel, pero que los tres científicos galardonados lo merecían”*.

Con anterioridad al descubrimiento del equipo francés, el grupo de Gallo había descubierto los primeros retrovirus humanos (HTLV-I y HTLV-II) asociados a cáncer y el factor de crecimiento de linfocitos

T, interleucina 2 (IL-2), que fue clave para el crecimiento de los cultivos celulares y aislamiento del virus del Sida por el equipo de Montagnier. Es en 1984 cuando el grupo de Gallo describe en una serie de publicaciones en la revista Science el aislamiento del virus del Sida y demuestra la relación causa-efecto (6, 9). El hecho de aislar el virus en muestras de distintos pacientes, su tropismo por células T CD4+ y el aislamiento de virus en simios que causa inmunodeficiencias parecidas al Sida determina que en 1984 se acepte por la comunidad científica al virus como responsable del Sida, lo que fue verificado posteriormente con el aislamiento del VIH-2 en pacientes con Sida en el oeste de África. La polémica de la disputa sobre el descubrimiento del virus del Sida alcanzó el máximo nivel cuando los Presidentes de Francia, Jacques Chirac y de EE.UU, Ronald Reagan firmaron en 1987 un acuerdo por el que se dividían los beneficios generados por el test de detección del virus VIH en sangre, acreditando a Montagnier y Gallo como co-descubridores del VIH. Sin embargo en 1990 el gobierno americano después de un examen exhaustivo por una comisión sobre cómo se aisló el VIH en el laboratorio de Gallo, que había recibido muestras procedentes del Pasteur y que este laboratorio aisló el mismo virus que los franceses pero que luego atribuyó el aislamiento a una contaminación de las muestras americanas con las francesas, reconoció que fue el grupo francés el primero en aislar el VIH (11), un año antes que el grupo de Gallo. Aunque Gallo y Montagnier han recibido numerosas distinciones y premios internacionales, entre ellos el Príncipe de Asturias, como co-descubridores del VIH (12), la polémica del descubrimiento ha sido finalmente resuelta por la Asamblea Nobel con el reconocimiento del descubrimiento del VIH por los dos investigadores franceses.

3. LA PANDEMIA VIH/SIDA

Gracias al establecimiento de un test rápido para la detección del virus en sangre, los estudios epidemiológicos y clínicos pronto reconocieron que el VIH se estaba extendiendo rápidamente en la población y que su transmisión era por vía sexual, transfusiones, en hemofílicos, de madres a hijos y en toxicómanos por uso de jeringas contaminadas. Se observó que el curso de la enfermedad se podía dividir en tres estadios: primario o de infección aguda, crónico o asin-

tomático, y avanzado o Sida. En 25 años que han transcurrido desde el descubrimiento del VIH, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que unos 45 millones de personas están infectados a nivel mundial, la pandemia ha producido unos 23 millones de defunciones, con una tasa de infección actual de unos 3 millones de personas por año.

4. CARACTERÍSTICAS DEL VIH

Existen tres tipos de linajes virales, M, N y O, siendo el grupo M el más frecuente. Dentro del grupo M hay nueve subtipos de virus (A, B, C, D, F, G, H, J, K), que difieren entre si un 20-35%, por lo que la variabilidad genética del VIH en un individuo infectado es muy alta. La distribución de los distintos subtipos de virus globalmente es muy variada, siendo el subtipo B el más prevalente en Europa y América del Norte, mientras que el subtipo C es mas abundante en Asia y representa más del 50% de todas las infecciones mundiales. Debido a coinfecciones de distintos subtipos en un mismo individuo y la movilidad de las personas entre continentes, han resurgido virus híbridos, actualmente unas 15 formas recombinantes en circulación, como B/F en América del Sur, el B/C en China, el A/E en Tailandia, el A/C en el Oeste de África y otros.

Existe consenso de que el origen del VIH procede de una transmisión entre especies de monos al hombre, a partir del virus de la inmunodeficiencia del chimpancé (SIVcpz) por abrasiones o ingesta. Aunque existen más de 20 especies de monos africanos, ninguno ha sido relacionado con la transmisión del VIH y sólo el SIVcpz es el que tiene un genoma viral con secuencias semejantes al VIH. Estudios evolutivos indican que el SIVcpz pudo pasar a humanos a principios del siglo XX.

La organización genómica del VIH (9.7 kb) es mucho más compleja que la de los retrovirus que infectan animales, habiendo adquirido además de los genes estructurales comunes con otros retrovirus (Gag, Pol, Env) otros seis genes adicionales (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev, Nef). El virus inicia su ciclo replicativo con la absorción de partículas virales a la molécula CD4 en la superficie de las células sensibles, así como su unión al co-receptor CC o CXCR4 de la familia de recepto-

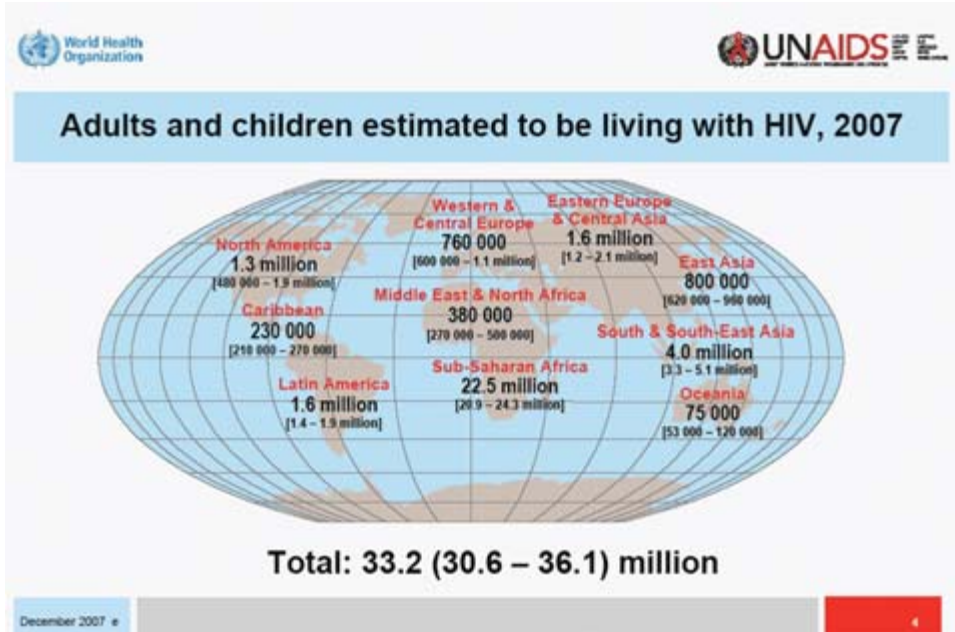


Figura 3. Distribución mundial de la infección por VIH según la OMS. Aunque la pandemia afecta a todos los continentes, la región mas afectada es la Subsahariana en África, donde hay países con más de la mitad de la población infectada, mayoritariamente la gente joven. La OMS considera que con la extensión actual del Sida para el año 2015 la población infectada puede alcanzar los 60 millones. En China, con una población alrededor de 1.200 millones de personas, cuyos primeros casos de Sida aparecieron a mediados de la década de 1980, por importación del factor sanguíneo VIII, el virus se ha extendido en todo el país con datos estadísticos en octubre de 2007, aportados por el Ministerio de Sanidad Chino, de unas 700.000 personas infectadas (13), muchas de ellas por contagio heterosexual, y con predicciones de aumento anual de alrededor un 8%. La epidemia se sigue extendiendo por el Este de Europa y Sur de Asia que junto con China pueden superar en poco tiempo las cifras de infección africanas.

res de citocinas, siendo los dos co-receptores mas importantes CXCR4 y CCR5, por lo que se produce la fusión entre la membrana viral y la celular con entrada viral. El descubrimiento del co-receptor del VIH fue una empresa ardua, pues aunque se conocía la molécula CD4 como necesaria para la infección, no era suficiente para su fusión y entrada en los linfocitos. Tuvo que transcurrir mas de una década para descubrir el co-receptor. Recuerdo que estando en París en una reunión del grupo europeo de desarrollo de una vacuna contra el VIH y

asistiendo junto con un grupo de unos 10 científicos a una cena con el Profesor Montagnier en un restaurante parisino, en los postres nos manifestó que investigadores del Pasteur habían descubierto la molécula co-receptor del VIH. Ante el asombro de todos y la curiosidad por conocer cuál era dicha molécula, Montagnier nos comunicó que era el receptor CD26 y que su descubridor era el Dr. Ara Hovanessian, a quien conocía muy bien por sus excelentes estudios sobre interferones y con el que había colaborado en un trabajo de investigación sobre la proteína PKR. Al día siguiente, Montagnier nos presentó en la sesión científica de la mañana los datos sobre la identificación del co-receptor y nos comunicó que el trabajo se publicaría en Science. Cual no sería mi sorpresa cuando al llegar a Madrid por la tarde me encuentro con la noticia que dan las cadenas de televisión sobre el descubrimiento del co-receptor CD26 por el grupo del Pasteur (en dicha publicación no figuraba Montagnier). Desafortunadamente, este hallazgo no tuvo la solidez científica suficiente por la metodología empleada ya que al poco tiempo se demostró que el receptor CD26 no era necesario para la entrada del VIH. Fue en 1996 cuando varios grupos publicaron en Nature, Science y Cell el descubrimiento de los co-receptores principales del VIH como CXCR4 y CCR5, aunque otros receptores de quimiocinas pueden ser también utilizados por el VIH.

La unión del VIH con la membrana celular la efectúa la proteína Env viral a través de la molécula gp120 resultante del corte proteolítico inducido por proteasas tipo furina sobre el precursor gp160 dando lugar a las proteínas gp120 y gp41. Es la proteína gp120 la que interacciona con la molécula CD4, que tiene 55 kilodaltons y es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, así como con el co-receptor CXCR4 o CCR5 que es una proteína que atraviesa la membrana siete veces. Después de la entrada por fusión, la subpartícula viral se libera en el citoplasma e inicia la retro-transcripción del RNA genómico viral en DNA que es parcialmente bicatenario y que junto con las proteínas Gag y Pol virales y factores celulares es transportado al núcleo donde copias completas de doble cadena de DNA son integradas en el genoma celular de la célula infectada. Cuando los linfocitos son activados, las copias integradas del DNA sirven de molde a la RNA polimerasa II para producir RNA viral mediante el concierto de las proteínas Tat, el factor nuclear NF- κ B y el factor transcripcional Sp1. Los RNAs producidos, sin procesar o procesados, son exportados del

núcleo al citoplasma utilizando un mecanismo de transporte único mediado por la proteína viral Rev. Se produce la proteína Env (gp160) en el retículo endoplásmico, mientras que Gag y Gag-Pol son sintetizadas, transportadas a la membrana plasmática y en asociación con dímeros de RNA forman una estructura viral inmadura a la que se asocia Env. Mediante procesamiento proteolítico de Gag y Pol, durante o inmediatamente después de la liberación de la partícula viral, se forman virus maduros con el nucleoide en forma de cono, que es la morfología característica del VIH visualizada por microscopía electrónica en comparación con la morfología de otros retrovirus con dimensiones entre 100-120 μm .

5. IMPORTANCIA DEL DESCUBRIMIENTO DEL VIH

Tan pronto como se demostró que el VIH era responsable del SIDA y que se podía crecer y purificar a partir de cultivos celulares se inició una carrera meteórica para tratar de dilucidar las claves de la biología del virus, capacidad para infectar a las células del sistema inmune y destruirlas, estructura y función de cada uno de los genes virales, así como el desarrollo de fármacos y vacunas capaces de prevenir el proceso infeccioso. Se puede decir que nunca en la historia de la humanidad se ha avanzado tanto en el conocimiento del agente causal de una enfermedad. Ha sido y sigue siendo un ejemplo de colaboración entre científicos, clínicos, empresas del sector farmacéutico, grupos sociales, fundaciones y gobiernos. Es de destacar la presión que la sociedad ha ejercido para impulsar ayudas a la investigación de esta enfermedad, como el ejemplo que dio el actor Rock Hudson al presentarse en la televisión americana, junto con la actriz Liz Taylor, declarando que padecía SIDA y pidiendo ayuda para que se investigara la enfermedad, al que siguieron otros famosos del cine, deportes y de otras actividades. En poco tiempo el estigma social que representaba la enfermedad por no tener cura y por su contagio sexual y por fluidos corporales, fue superándose a medida que se conocía mejor la biología y epidemiología del virus, su transmisión y la aparición de los primeros fármacos antirretrovirales capaces de reducir la infección. El desarrollo del test de detección del VIH en sangre fue determinante para diagnosticar la presencia del virus en fases tempranas de contagio y evitar su extensión en la población.

Los procedimientos de clonaje del VIH a partir de muestras de sangre y de otros tejidos de pacientes y su secuenciación permitieron llevar a cabo estudios sobre el origen y evolución del VIH, así como definir la alta tasa mutacional del virus, particularmente de la proteína Env en la membrana viral lo que posibilita la evasión del virus a los anticuerpos que produce el organismo. Es probable que el virus pasara del chimpancé al humano a principios del siglo XX, pero lo que no está claro es el por qué la epidemia se extendió tan rápidamente en la población a partir de la década de 1970 en adelante.

Con la aparición en 1987 del primer antirretroviral, AZT, se inicia la carrera por la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos a bloquear distintos estadios del ciclo replicativo viral, lo que se sucedería en el tiempo, sobre todo a medida que se desentrañaba la biología molecular del virus. Aunque los primeros fármacos daban lugar a resistencias, no fue hasta 1995 cuando se instituye la llamada terapia HAART que utiliza varios fármacos administrados simultáneamente y en combinación. Se observó que la progresión de la enfermedad estaba directamente relacionada con la capacidad replicativa del VIH en el organismo y que la terapia HAART aumentaba la vida de los pacientes (14). Así, aquellos individuos con más de 100.000 copias del RNA viral en plasma sanguíneo a los seis meses de ser infectados, tienen 10 veces más probabilidad de desarrollar SIDA en 5 años que aquellos infectados con tasas más bajas de viremia. Como indicadores de la evolución de la infección al tratamiento con fármacos se mide en los pacientes la carga viral y número de linfocitos T CD4+ en sangre. Así pues, a medida que se conocían más los distintos aspectos del ciclo replicativo viral y la estructura de sus proteínas, se han ido desarrollando nuevos fármacos que bloquean, bien la entrada viral actuando sobre la proteína Env, los co-receptores, el proceso de fusión virus-célula, la actividad RT, la proteasa e integrasa, así como la acción de las proteínas no estructurales Nef, Rev, Tat, Vif y Vpr. También se están buscando fármacos dirigidos frente a co-factores celulares de la infección por VIH. Actualmente existen unos 30 fármacos antirretrovirales y se siguen buscando nuevos fármacos, debido a la alta tasa mutacional del VIH y la aparición de resistencias durante el tratamiento. Ello obliga a combinar las terapias y hacer un seguimiento de cada paciente. Esta combinación de fármacos y resistencias en los pacientes que reciben HAART hace muy difícil el tratamiento de la infección en los países pobres

donde la pandemia de SIDA sigue su curso mortal. Para ver información sobre resistencias del VIH a drogas consultar (www.hiv.lanl.gov; <http://hivdb.stanford.edu>; www.iasusa.org).

Aunque los investigadores franceses pensaron que al descubrir el VIH se podría desarrollar una vacuna con los procedimientos tradicionales (virus inactivado, atenuado o a base de proteínas virales) que tanto éxito habían aportado contra otras infecciones virales (viruela, polio, sarampión, hepatitis B, ect.), sin embargo el tiempo ha demostrado que existen grandes dificultades para este logro. Ello se debe fundamentalmente a la alta tasa mutacional del virus y a la diversidad de subtipos en el mundo. Es precisamente la heterogeneidad que se produce en los aislados del VIH que dificulta la consecución de una vacuna (15). Los ensayos clínicos realizados hasta el momento no han demostrado ningún éxito de las vacunas que han sido ensayadas. Las mayores expectativas que se habían depositado en el ensayo clínico en fase IIb (3000 individuos con riesgo de infección por VIH) por la empresa Merck en colaboración con el NIH (estudio STEP) utilizando un recombinante de adenovirus expresando las proteínas Gag-Pol-Nef del VIH subtipo B ha sido un fracaso (ClinicalTrials.gov.numbers, NCT00095576 y NCT00413725; ensayos STEP y Phambili). Estos dos ensayos de eficacia tuvieron que terminarse antes de tiempo al observar en el ensayo STEP una mayor incidencia de infección en algunos vacunados y ninguna reducción de la carga viral en todos los vacunados, con o sin anticuerpos frente a adenovirus. La razón de una mayor infección no se conoce aunque estos individuos tenían altos niveles de anticuerpos contra adenovirus y la administración de la vacuna podía provocar una expansión de las células T CD4+ susceptibles de ser infectadas mejor por el VIH. Otra posibilidad es que los anticuerpos neutralizantes de adenovirus opsonizaran al vector vacunal lo que podría producir un cambio de tropismo y de respuesta inflamatoria. Actualmente se está a la espera de conocer la eficacia del único ensayo clínico en fase III que se ha realizado (Tailandia) entre una población de 16.000 individuos vacunados con una combinación de un vector de poxvirus (ALVAC) y la proteína gp120. Los datos se conocerán en 2009. Las vacunas basadas en poxvirus y en particular los vectores atenuados MVA y NYVAC han sido objeto de un estudio europeo (EuroVac) en los que participa mi grupo de investigación con

la finalidad de desarrollar una vacuna contra el VIH (www.eurovacc.org). En 1989 ya habíamos producido vectores atenuados del virus vaccinia con posibilidades de su uso vacunal (5), pero no ha sido hasta el año 2008 cuando en colaboración con EuroVacc hemos completado los estudios preclínicos y clínicos sobre la capacidad de inducir respuesta celular específica frente a los antígenos del VIH. Utilizando modelos de ratón (16) y macacos (17) demostramos que la vacunación con DNA y los vectores MVA o NYVAC expresando los antígenos Env/Gag-Pol-Nef inducían en los dos modelos animales una fuerte respuesta inmune celular de linfocitos T CD4+ y TCD8+ específicos que protegían a los macacos después del desafío con una cepa virulenta del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). Esta protección era duradera, más de un año.

Este mismo protocolo de vacunación fue ensayado en humanos con voluntarios sanos (fase I) demostrando que más del 90% de los voluntarios desarrollaban respuestas inmunes específicas frente a los distintos antígenos del VIH, aunque mayoritariamente dirigidos frente a Env. La respuesta inmune se mantuvo al menos durante 75 semanas después de la vacunación (18).

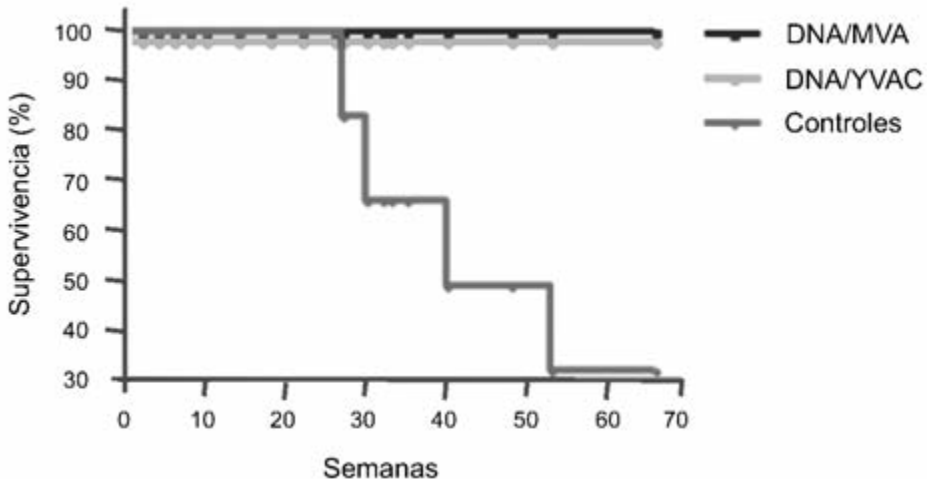


Figura 4. La vacunación con DNA/Poxvirus protege frente a la infección por SIV (17).

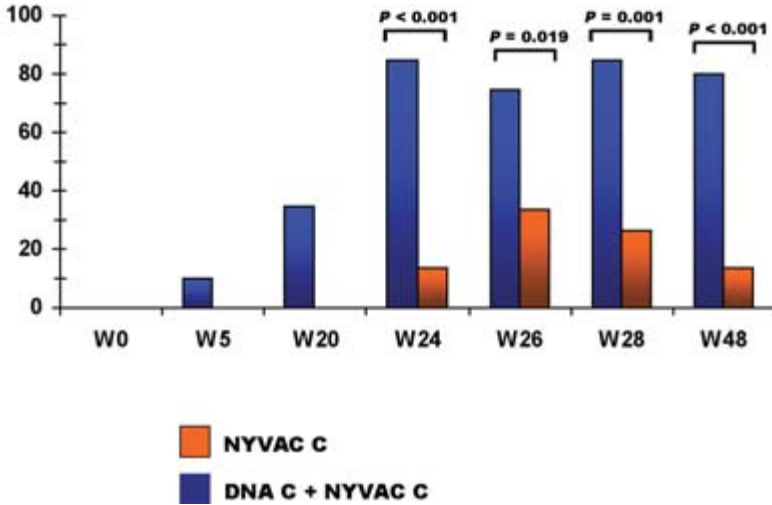


Figura 5. La vacunación con vectores de DNA y poxvirus (NYVAC) produce un alto porcentaje de personas que inducen respuestas inmunes específicas frente a los antígenos del VIH (18).

Está en marcha otro ensayo clínico en fase II con 140 individuos para valorar la dosis de DNA y del vector NYVAC y en España nos ha sido aprobado un ensayo clínico en fase I con el vector MVA-B que se iniciará a principios de 2009 en voluntarios sanos. Para facilitar el acceso de las vacunas a una mayor población, sobre todo en los países pobres, hemos demostrado en modelo de macaco que los vectores atenuados de poxvirus MVA y NYVAC pueden ser administrados por aerosol con la misma eficacia que cuando se administran por ruta parenteral (19). Es indudable que en la experimentación con vacunas frente al VIH se hace necesario demostrar en modelos de monos que dichas vacunas son eficaces frente al virus patógeno SIV para evitar fracasos clínicos (20, 21).

Aunque aún no hemos conseguido demostrar que las vacunas son eficaces frente al VIH, sin embargo los estudios con monos nos sugieren que se puede conseguir protección con los protocolos de combinación de vacunas con vectores como adeno, pox y DNA (21). Lo importante es que las vacunas activen tanto una respuesta humoral con anticuerpos neutralizantes frente a distintos subtipos y variantes

del VIH como una fuerte respuesta celular (CD4+ y CD8+) que sea polifuncional (capaz de provocar a las células activadas la secreción de varias citoquinas y quimiocinas, como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, MIP-1alfa y otras). Aunque es indudable que lo mejor para evitar la extensión de la pandemia por VIH y su control son las vacunas, y así lo ha reconocido la OMS, hace falta un mayor esfuerzo global para conseguir este gran objetivo tan necesario para evitar tantas muertes y sufrimiento en la población. Mientras que la terapia antirretroviral ha conseguido en los países desarrollados mantener la esperanza de vida a niveles casi semejante a las personas no infectadas, el virus sigue extendiéndose y la aplicación de la terapia antirretroviral es de difícil implementación en los países pobres y más afectados por la epidemia. Es predecible que sea la combinación de vacunas y fármacos administrados de forma profiláctica y terapéutica lo que consiga controlar y erradicar al VIH.

6. CÓMO SE DESCUBRIÓ EL VPH COMO CAUSANTE DEL CÁNCER CERVICAL

Aunque en la década de los años 1970 se especulaba con que el cáncer cervical podía tener una etiología viral, y se asociaba a los herpesvirus, fue zur Hausen quien remando contra las olas, pues esa era la hipótesis prevalente en la época, propuso que el responsable del cáncer cervical era un virus papiloma humano (VPH). Si la hipótesis era correcta entonces las células tumorales de una paciente debían de contener integrado en su DNA el material genético viral. Fue esta hipótesis la que mantuvo contra viento y marea el trabajo de zur Hausen durante más de 10 años buscando tipos del VPH en el DNA celular. La dificultad radicaba en que sólo partes del genoma viral estaban integradas en el genoma celular. La búsqueda dio sus resultados encontrando nuevos tipos de VPH en biopsias de cáncer cervical y descubriendo en 1983 al VPH tipo 16 como altamente tumorigénico. Primero aisla HPV 16 en biopsias de cáncer cervical (3), seguido por la primera demostración de HPV16 en lesiones precursoras de cáncer genital (22) y posteriormente aisla VPH 18 en cáncer genital (23). Mediante el clonaje de los tipos VPH 16 y 18 en pacientes con cáncer cervical, encuentra que la frecuencia con la que aparece DNA de los tipos 16 y 18 en las biopsias de cáncer cervical a nivel mundial es de un 70% en tumores genitales. Así se

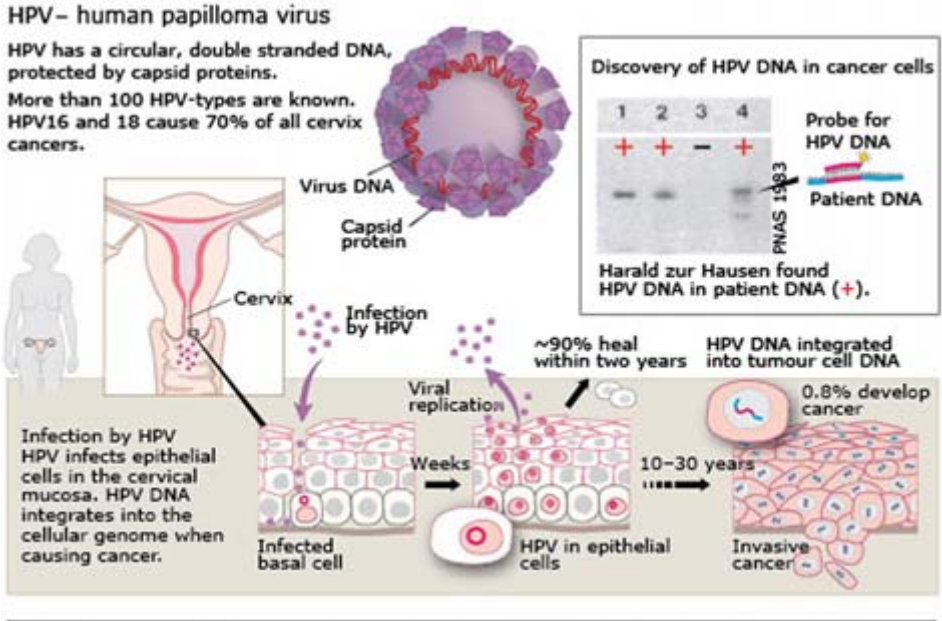


Figura 6. Esquema tomado de la Fundación Nobel sobre el descubrimiento del virus papiloma como agente causal del cáncer cervical.

demuestra que el VPH es un problema sanitario global. De hecho más del 5% de todos los cánceres humanos tienen una etiología viral con la persistencia de la infección por VPH. Estudios epidemiológicos demuestran que la infección por VPH es la mas común entre los agentes de transmisión sexual, afectando entre el 50-80% de la población. De los más de 100 tipos de VPH conocidos, cerca de 40 infectan el tracto genital y 15 de ellos pone en riesgo a las mujeres para contraer cáncer cervical. Además, el VPH se encuentra en la vulva, pene, cavidad bucal y asociado a otros cánceres. De que el cáncer cervical es producido por VPH lo acredita el hecho de que el virus está presente en el 99.7% de las mujeres con cáncer, afectando a más de 500.000 mujeres al año. La tasa de mortalidad en mujeres con cáncer cervical es del 50%, lo que da una idea del impacto social.

Las investigaciones de zur Hausen dieron lugar al conocimiento de los mecanismos que utiliza el VPH como carcinogénico y los factores que predisponen en la persistencia viral y transformación tumo-

ral (24). Generosamente puso a disposición de la comunidad científica los tipos 16 y 18 del VPH. Gracias a las investigaciones de zur Hausen se pudieron desarrollar vacunas que han demostrado su eficacia frente a la infección, confiriendo más del 95% de protección frente a los tipos 16 y 18 del VPH.

7. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Los papilomavirus comprenden un grupo de virus icosaédricos que replican en el núcleo, sin envuelta y con un DNA circular de doble banda con 8000 pares de bases. La partícula viral contiene 72 capsómeros pentaméricos. El genoma tiene diez fases de lectura y codifica por las proteínas estructurales L1 y L2 que representan el 80% de la partícula viral y las proteínas reguladoras E1 a E8, siendo las proteínas E6 y E7 las que ejercen propiedades oncogénicas (2, 25). La proteína E6 actúa sobre el represor tumoral p53 e induce su degradación, mientras que E7 actúa sobre el represor tumoral pRb provocando su inactivación. El resultado final es la desregulación del ciclo celular y consiguiente proliferación celular. Tanto la proteína E6 como E7 se asocian a otras proteínas celulares durante el proceso de transformación tumoral.

La infección productiva del VPH se inicia en las células del epitelio basal a través de una herida. La infección comienza cuando las proteínas de la cápsida viral se unen a los receptores en la membrana celular. Después de la unión a la célula, el genoma viral se traslada al núcleo para comenzar el proceso de replicación y donde persiste mucho tiempo, transmitiéndose a las células hijas durante la mitosis. Durante la fase de expresión temprana se producen las proteínas codificadas por los genes con capacidad oncogénica, E6 y E7, y a tiempos tardíos se producen las proteínas estructurales L1 y L2 responsables de la formación de partículas virales al incorporar el DNA viral durante el proceso de ensamblaje. La producción final de viriones infectivos requiere la diferenciación terminal de las células infectadas en el epitelio. La liberación de viriones se produce al final de la vida de las células epiteliales por proceso normal de descamación. Como este es un proceso no lítico no se produce inflamación. La replicación viral durante la diferenciación celular puede dar lugar a cambios citopatológicos que se consideran benignos (denominados CIN 1). Es la persistencia viral la que determina el desarrollo de cáncer cervical.

Los estudios epidemiológicos indican que la edad media para tener cáncer cervical es varias décadas después de la infección inicial.

8. CONTROL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO CON VACUNAS

La demostración de que la proteína L1 de la cápsida del virus del papiloma daba lugar a la formación de pseudo-partículas (formas estructurales semejantes a las del virus infectivo pero sin tener genoma viral) y que una vez administradas por ruta intramuscular a voluntarios sanos reducía de forma significativa la infección por VPH, supuso un avance importante en la consecución de una vacuna frente a VPH. Fruto de estas investigaciones y en una serie de ensayos clínicos que la industria farmacéutica ha llevado a cabo durante años y con fuertes inversiones, son los dos tipos de vacunas actuales, conocidas con los nombres de Gardasil (empresa Merck) y Cervarix (empresa Glaxo-SKB). Ambas vacunas se diferencian en los componentes de L1 de distintos tipos de virus, así como en el adyuvante que se incorpora a la vacuna. Así, Cervarix ha sido diseñado para prevenir las infecciones causadas por VPH 16 y 18, que son los dos tipos de virus causantes del 70% de cánceres cervicales. Sin embargo Gardasil se dirige frente a los tipos VPH 6, 11, 16 y 18, responsables del 75-90% de lesiones genitales. Estas vacunas producen anticuerpos neutralizantes y en menor medida respuesta celular. Los ensayos clínicos profilácticos han demostrado la eficacia de la vacunación para prevenir en más del 95% la aparición de infecciones frente a virus del mismo serotipo y la aparición de precursores celulares de cáncer cervical (26, 27). Sin embargo ninguna de las dos vacunas ha demostrado eficacia terapéutica, lo que indica que no parece probable que la vacunas actuales sean capaces de inducir regresión cuando ya existen lesiones genitales externas. Por ello se están ensayando otras vacunas basadas en distintos vectores y conteniendo además de L1 otros antígenos virales como L2. El éxito de la vacunación profiláctica contra VPH ha estimulado la práctica de la vacunación en chicas jóvenes. En España, algunas Comunidades financian la vacunación a adolescentes entre los 13-15 años. Es probable la vacunación contra VPH se incluya entre los protocolos de inmunización habituales establecidos por las autoridades sanitarias de distintos países. El alto coste de las vacunas actuales limita su uso, lo que es especialmente relevante en los países pobres. En el

futuro conoceremos durante cuanto tiempo la vacunación previene de la aparición de cáncer cervical, niveles de anticuerpos neutralizantes y de respuesta celular, cuantas dosis de recuerdo son necesarias, y si hay efectos secundarios adversos durante el embarazo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-71.
2. zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 342-50.
3. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 80: 3812-5.
4. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305: 1425-31.
5. Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Rodriguez, J.F., Trauber, D. & Esteban, M. (1989) Highly attenuated vaccinia virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 86: 1287-91.
6. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. & Gallo, R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224: 497-500.
7. Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. & Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225: 840-2.
8. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., et al. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science*. 232: 697.
9. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500-3.
10. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*. 40: 9-17.
11. Montagnier, L. (2002) Historical essay. A history of HIV discovery. *Science*. 298: 1727-8.
12. Gallo, R.C. & Montagnier, L. (2003) The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* 349: 2283-5.
13. Lu, L., Jia, M., Ma, Y., Yang, L., Chen, Z., Ho, D.D., et al. (2008) The changing face of HIV in China. *Nature*. 455: 609-11.
14. Palella, F.J. Jr, Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., et al. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 338: 853-60.

15. Fauci, A.S., Johnston, M.I., Dieffenbach, C.W., Burton, D.R., Hammer, S.M., Hoxie, J.A., et al. (2008) HIV vaccine research: the way forward. *Science*. 321: 530-2.
16. Gomez, C.E., Najera, J.L., Jimenez, V., Bieler, K., Wild, J., Kostic, L., et al. (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 25: 1969-92.
17. Mooij, P., Balla-Jhagjhoorsingh, S.S., Koopman, G., Beenhakker, N., van Haaften, P., Baak, I., et al. (2008) Differential CD4+ versus CD8+ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J. Virol*. 82: 2975-88.
18. Harari, A., Bart, P.A., Stohr, W., Tapia, G., Garcia, M., Medjitna-Rais, E., et al. (2008) An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 205: 63-77.
19. Corbett, M., Bogers, W.M., Heeney, J.L., Gerber, S., Genin, C., Didierlaurent, A., et al. (2008) Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 2046-51.
20. Watkins, D.I., Burton, D.R., Kallas, E.G., Moore, J.P. & Koff, W.C. (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med.* 14:617-21.
21. Barouch, D.H. (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*. 455: 613-9.
22. Ikenberg, H., Gissmann, L., Gross, G., Grussendorf-Conen, E.I. & zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int. J. Cancer*. 32: 563-5.
23. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. & zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J.* 3: 1151-7.
24. Woodman, C.B., Collins, S.I. & Young, L.S. (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer*. 7: 11-22.
25. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., et al. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 314: 111-4.
26. Koutsky, L.A. & Harper, D.M. (2006) Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine*. 24 Suppl 3: S3/114-21.
27. Schiller, J.T., Castellsague, X., Villa, L.L. & Hildesheim, A. (2008) An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 26 Suppl 10: K53-61.

El descubrimiento de las proteínas fluorescentes y su utilidad en la investigación biomédica (Premio Nobel de Química de 2008)


José Javier Lucas*

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBM“SO”, CSIC/UAM) y Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed, Instituto de salud Carlos III).

El premio Nobel de Química 2008 ha sido otorgado a los científicos Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien por el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus iniciales en inglés) y por el desarrollo de herramientas derivadas de ésta para su aplicación en biotecnología y en investigación biomédica (1).

1. LOS PROTAGONISTAS Y LA SECUENCIA DE SUS DESCUBRIMIENTOS

El primer protagonista de la serie de descubrimientos laureados es Osamu Shimomura de nacionalidad estadounidense aunque nacido en Kyoto (Japón) en 1928 (1). Su carrera como biólogo marino estuvo llena de dificultades debidas a la Segunda Guerra Mundial y la consiguiente devastación de Japón en los años de posguerra. Pese a ello, en 1955, fue contratado como ayudante por el profesor Yashimasa Hirata de la Universidad de Nagoya. El profesor Hirata le encomendó la tarea de aislar e identificar la sustancia que hace que un triturado del molusco *Cypridina* brille en contacto con el agua. Se trataba de un proyecto difícil en el que ya había fracasado un grupo de investigación estadounidense líder en el campo. Hirata prefirió encomendar este proyecto a Shimomura en lugar de a estudiantes de doctorado para no comprometer las posibilidades de éstos de llevar a buen término una tesis doctoral. Contra todo pronóstico, en 1956 Shimomura consiguió aislar la proteína responsable de la luminiscencia de *Cypridina*. La proteína purificada emitía una



The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"




		
Photo: J. Henriksson/SCANPIX	Photo: J. Henriksson/SCANPIX	Photo: UCSD
Osamu Shimomura	Martin Chalfie	Roger Y. Tsien
🕒 1/3 of the prize	🕒 1/3 of the prize	🕒 1/3 of the prize
USA	USA	USA
Marine Biological Laboratory (MBL) Woods Hole, MA, USA	Columbia University New York, NY, USA	University of California San Diego, CA, USA
b. 1928 (in Kyoto, Japan)	b. 1947	b. 1952

Figura 1. Comunicado Original y fotografías de los investigadores premiados que aparecen en la web oficial de la Fundación Nobel (reproducido a partir de del contenido de la página web http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/).

luz 37.000 veces más brillante que la emitida por el triturado del molusco. Tras publicar sus resultados (2), Shimomura fue fichado por el profesor Frank Johnson de la Universidad de Princeton en Nueva Jersey (Estados Unidos). Como regalo de despedida, el Profesor Hirata se encargó de que Shimomura recibiera el título de doctor por la Universidad de Nagoya (1).

En el otoño de 1960, poco después de la llegada de Shimomura a Princeton, el profesor Johnson le enseñó un pequeño frasco con un polvo blanco y le explicó que se trataba de un liofilizado de *Aequorea victoria*, una medusa luminosa del orden Hydrozoa que vive en las costas occidentales de Norteamérica. *Aequorea victoria* tiene unos pequeños organos lumínicos en el borde de la umbrela, justo en la base de cada tentáculo, que emiten un destello de luz verdosa cuando la medusa es agitada o sacudida. Johnson le explicó a Shimomura que si se mezclaba ese liofilizado con agua, emitía luz. Tal y como relata el propio Shimomura (3), la demostración que el doctor Johnson intentó realizar a continuación no funcionó, pero era tal el entusiasmo que ponía en describir la brillante luminiscencia de las medusas vivas que abundan en las costas en torno a Friday Harbour en el estado de Washington que Shimomura no pudo resistirse a aceptar el proyecto de identificar la molécula o moléculas responsables de esta bioluminiscencia. Así, a principios del verano de 1961, Shimomura, su esposa, el doctor Johnson y un ayudante, pertrecharon la furgoneta que Johnson acababa de comprar para la ocasión y emprendieron un viaje de siete días hasta Friday Harbour. Una vez allí, el doctor Robert Fernald, el director de los Friday Harbour Laboratories, les condujo al pequeño laboratorio en el que Shimomura y el resto del equipo llevaron a cabo las dos tareas principales de la expedición: por un lado, aprender a recolectar de las medusas la actividad bioluminiscente en condiciones de manipulación en las cuales la actividad lumínica estuviera reversiblemente inhibida y, por otro lado, recolectar una cantidad ingente de medusas para producir extractos suficientes para posteriormente en Princeton aislar la molécula o moléculas responsables de la actividad. Desoyendo los consejos del doctor Johnson que estaba centrado en la hipótesis de que el sistema luminiscente de *Aequorea* sería similar al de la Luciferina-luciferasa, Shimomura se centró en inactivar la actividad manteniendo los triturados de medusa en pH ácido y después comprobó que los extractos libres de células recuperaban la luminiscencia al restaurar un pH neutro. Pero el gran avance fue por casualidad al arrojar Shimomura restos de extracto en la pila y observar un destello lumínico, aunque azul y no verdoso, como hubiera sido de esperar. Como la pila contenía restos de agua de mar, comprendió que uno de los componentes de esta sería el responsable de esa activación. La composición del agua marina era bien conocida y pronto Shimomura comprobó que era el Ca^{2+} el

responsable de la activación y, por tanto, que el EDTA sería la gran herramienta para mantener la actividad reversiblemente inhibida. El resto del verano, lo dedicaron a recolectar el máximo posible de ejemplares de medusa en los bancos que pasaban mañana y tarde con las mareas para inmediatamente recortar los bordes de las sombrillas de las medusas con tijeras y después preparar el extracto de los mismos. Cuando llevaban recolectados unos 10.000 ejemplares, por alguna razón, las medusas dejaron de aparecer con las mareas. El grupo volvió a Princeton con el extracto de medusa empaquetado en hielo seco. Tras muchas rondas de cromatografía en distintos tipos de columnas, a principios de 1962, fueron capaces de juntar 5 miligramos del principio activo. La sustancia capaz de emitir luz cuando se añadía calcio resultó ser una proteína de un peso molecular en torno a 20.000 a la que denominaron Aequorina. A lo largo del proceso de purificación de la Aequorina también se observaba otra proteína que emitía una luz verdosa. En la publicación de la Aequorina Shimomura menciona por primera vez como “proteína verde” la que ahora todos conocemos como GFP. Se refirió a ella como una proteína que también se obtiene durante el proceso de purificación de Aequorina y que “hace que las soluciones tomen un color verdoso a la luz solar, sólo amarillento con luz de bombilla y una muy brillante fluorescencia verde si se iluminan con luz ultravioleta”.

No fue hasta la década de los 70 que Shimomura y demás investigadores se dieron cuenta de que, en la medusa, tiene lugar una transferencia energética intermolecular entre la Aequorina y la GFP. La Aequorina, en respuesta al calcio, emite una luz azul que es captada por la GFP resultando en fluorescencia verde. En 1979, Shimomura identificó el cromóforo de la GFP, que es el responsable de la fluorescencia (que no quimioluminiscencia) de la GFP. Este cromóforo, cuando recibe luz azul o ultravioleta absorbe la energía de la luz y la emite también en forma de luz pero con otra longitud de onda, en el espectro del verde.

A diferencia de las reacciones de bioluminiscencia que Shimomura había estudiado con anterioridad, en el caso de la GFP, no hacía falta ninguna otra proteína o cofactor para que la fluorescencia tuviera lugar. En esto, y en su pequeño tamaño, radica el potencial de la GFP como marcador biológico. Pero Shimomura nunca imaginó cuando caracterizó la GFP, la revolución que esto iba a suponer en biomedicina.

Douglas C. Prasher fue la primera persona que se dio cuenta del potencial de la GFP como marcador biológico o trazador vital. Prasher reportó el clonaje y la secuencia de la GFP en un artículo de 1992 en la revista *Gene* (4). El trabajo fue realizado en Woods Hole Oceanographic Institution con financiación de la American Cancer Society. El proyecto de investigación de Prasher financiado por la American Cancer Society precisamente tenía como objetivo el clonaje de la GFP para usarla como marcador de células tumorales y así poder visualizar la evolución de éstas en la progresión del cáncer o en respuesta a agentes anti-tumorales.

La colaboración de Prasher con los dos laureados Chalfie y Tsien fue clave e instrumental para el desarrollo de la técnica y se refleja en su coautoría en las publicaciones seminales de ambos laureados (5-7). El propio Chalfie ha declarado su pesar por no encontrarse Prasher entre los premiados (8), llegando a decir que hubiera sido igualmente justo que el premio lo hubiera recibido Prasher en detrimento del propio Chalfie. Nunca llegaremos a saber todas las razones que relegaron a Prasher fuera del premio, pero, el hecho de que Prasher no se llegó a estabilizar en el sistema científico tras trabajar para distintas instituciones estadounidenses, que sus últimas publicaciones científicas reflejadas en Medline datan de 1997 y que no trabajaba en ciencia en los últimos años, probablemente han sido factores decisivos.

El siguiente premiado en entrar en escena fue Martin Chalfie. Estadounidense, nacido en 1947, doctorado en Neurobiología por Harvard en 1977 y profesor de Biología de Columbia University en Nueva York desde 1982. El trabajo de Chalfie ha estado centrado en el estudio de la organogénesis y de la función neural del nematodo *C. elegans*, un pequeño gusano terrestre de apenas un milímetro de longitud, que se alimenta de bacterias del suelo. Este nematodo se utiliza como modelo animal por las muchas ventajas que aporta. Estas incluyen: su pequeño tamaño, que se puede criar en placas de petri con césped bacteriano y su corto ciclo vital. Pero sobre todo, su gran ventaja es el hecho de ser transparente lo que permite visualizar las 959 células que lo componen, así como las divisiones y migraciones celulares que tienen lugar desde el embrión de una sola célula hasta la formación del organismo adulto completo. Además, el gusano tiene un sistema nervioso rudimentario, que le permite interactuar con

su entorno, desplazarse y copular. Por último, las manipulaciones genéticas son fáciles en este organismo, cuyo genoma se conoce por completo y la mayoría de sus genes tienen homólogos en vertebrados, incluido el hombre, con lo que las claves sobre organogénesis y función neuronal obtenidas en el nematodo han permitido descifrar las claves de fenómenos similares en organismos superiores.

El interés de Chalfie por la GFP surgió en 1988, mientras escuchaba un seminario en Columbia sobre organismos bioluminiscentes. A partir del momento en que escuchó las cualidades de la GFP que la hacían candidata a ser un excelente trazador vital, Chalfie dejó de prestar atención al seminario obsesionado con la idea de cómo conseguir adaptarlo a sus estudios en *C. elegans*. Tras un par de días de pesquisas supo que Prasher estaba trabajando en el clonaje de la GFP rastreando genotecas de *Aequorea victoria* y se puso en contacto con él. Prasher envió el clon con la secuencia de la GFP a Chalfie y éste le encomendó a la estudiante Ghia Euskirchen que lo expresara en la bacteria *E. coli* (8). Un mes más tarde, la estudiante lo consiguió y, lo que es más importante, bastaba con mirar las bacterias transformadas en un microscopio de luz ultravioleta para ver que fluorecían. Quedaba así demostrado, que la proteína GFP no necesita ningún otro complemento de *Aequorea victoria* para emitir su fluorescencia verde. El siguiente paso que dieron en el laboratorio de Chalfie fue el de modificar genéticamente el gusano *C. elegans* de manera que resultara una estirpe que expresa el gen de la GFP bajo el promotor de un gen que está activo tan solo en las 6 neuronas mecanosensoras del nematodo. En el gusano resultante, al iluminarlo con luz ultravioleta, se distinguían perfectamente los cuerpos de estas neuronas y sus proyecciones axonales a lo largo del gusano en libre movimiento. Esto es lo que se observa en la portada del número de 11 de febrero de 1994 de la revista *Science* en el que Chalfie, Prasher y tres colaboradores más publicaron este primer uso de la GFP como marcador tanto en bacterias como en eucariotas (5). A partir de este momento, el número de publicaciones en las que se utiliza la GFP como marcador fue aumentando exponencialmente.

Pero la gran revolución en el uso de proteínas fluorescentes estaba aun por llegar. El protagonista de las mejoras que elevaron el potencial de la nueva herramienta fue el tercer galardonado, el estadou-

nidense Roger Y. Tsien. Nacido en Nueva York en 1952, Tsien se doctoró en fisiología por la Universidad de Cambridge (Reino Unido) en 1977 y es profesor la Universidad de California en San Diego (UCSD) desde 1989.

Las primeras de las muchas aportaciones de Tsien al conocimiento y mejora de las proteínas fluorescentes fue esclarecer el mecanismo molecular por el que la GFP adquiere su capacidad fluorescente y el desciframiento de la estructura tridimensional de la proteína. Tsien demostró que la GFP tiene una forma cilíndrica parecida a la de una lata de refresco cuyo centro alberga el fluoróforo (9) y, aunque la estructura del fluoróforo compuesto por los aminoácidos 65-67 ya había sido descrita por Shimomura (10) y posteriormente matizada por Prasher y colaboradores (11), Tsien demostró que para que el fluoróforo se forme es necesaria una reacción de oxidación en el centro del cilindro que es catalizada por la propia GFP (7).

El siguiente gran avance del grupo de Tsien fue descubrir que si introducía la mutación S65T en la secuencia peptídica de la GFP, la reacción de oxidación que forma el cromóforo es cuatro veces más rápida que en la versión silvestre. La nueva versión mejorada de la GFP resultante de esta modificación se denominó EGFP por las siglas en inglés de “enhanced green fluorescent protein” (12).

Las siguientes aportaciones de Tsien tuvieron que ver con la combinación de GFP con dominios funcionales de otras proteínas de manera que la fluorescencia variara según las condiciones del interior de la célula y se convirtiera así en un sensor funcional. El primer ejemplo de esto fue la fusión de la EGFP con dominios de calmodulina que unen calcio y producen cambios conformacionales que hacen que el espectro de emisión de la proteína vaya variando en función del número de iones que ha unido y, por tanto, a modo de indicador de la concentración de Ca^{2+} . La nueva versión de la proteína fluorescente modificada recibió el nombre de Camaleón (13, 14).

Finalmente, el otro tipo de mejoras introducidas por Tsien y sus colaboradores ha sido la que han ampliado el abanico de colores en que emiten las distintas versiones de la GFP y otras proteínas fluorescentes de distinto origen. Así, la primera mutagénesis de GFP que resultó en una versión que emitía en un color distinto al verde fue la que tenía una mutación en la posición 66 y que hacía que la tirosina

del fluoróforo fuera sustituida por una histidina. Esta nueva versión emitía en azul (7). El siguiente nuevo color fue debido a una mutación diseñada en función del conocimiento de la estructura tridimensional. Se trataba de la mutación T203Y que resultaba en una versión que emitía en amarillo y que se denominó YFP por las siglas de su nombre inglés “yellow fluorescent protein” (9).

Así pues, la mutagénesis de la GFP de *Aequorea victoria* resultó en nuevas versiones con espectros de emisión que abarcaban desde el azul al amarillo pasando por el cian y el verde. Pero en ningún caso llegaba al rango del anaranjado y del rojo. El siguiente avance en este sentido resultó de los trabajos de un grupo de científicos rusos entre los que se encuentran Sergey Lukyanov y sus colaboradores. Lo que hicieron estos científicos fue analizar si era posible encontrar análogos de GFP en corales fluorescentes. De hecho fueron capaces de encontrar seis proteínas de coral similares a la GFP de las cuales cuatro emitían en rango del verde/amarillo, una en el del azul y, por fin, una en el del rojo (15). La que emitía en rojo era de la especie del coral *Discosoma* y recibió el nombre de DsRed (16). Así mismo, la que emitía en amarillo recibió el nombre de citridina (16). Pese al gran avance de disponer por primera vez de una proteína fluorescente que emitía en el rango del rojo, el inconveniente de DsRed como trazador vital es que es una proteína de gran tamaño y, además, tetramérica. Es decir, que está formada por cuatro subunidades protéicas independientes. El siguiente logro de la factoría Tsien fue generar un versión monomérica de la DsRed mediante ingeniería genética (17). La proteína resultante se denominó mRFP por las siglas de “monomeric red fluorescente protein”.

Así pues, gracias al descubrimiento de la GFP de *Aequorea victoria* por Shimomura, su posterior aplicación como marcador celular vital por primera vez gracias a Chalfie (con la ayuda Prasher y colaboradores) y la generación de variantes de GFP así como de otras proteínas fluorescentes por Tsien y otros para que emitan en todos los colores del espectro visible así como para que actúen de biosensores al variar su fluorescencia según las condiciones del medio intracelular, en la actualidad las proteínas fluorescentes son una herramienta cotidiana en los laboratorios de biología molecular con numerosas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Describiremos a continuación algunas de estas múltiples aplicaciones.

2. MODOS Y EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

No se pretende aquí hacer una revisión sistemática ni exhaustiva de las innumerables aplicaciones que han tenido la GFP y sus derivados. Se citarán sólo algunos usos por lo generalizado de su empleo, otros muy concretos por lo llamativo o curioso de la aplicación y, por último, algunos de los que usamos en nuestro laboratorio para el estudio *in vivo* en modelos animales y celulares de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington.

Una primera distinción entre el tipo de usos que se ha dado a las proteínas fluorescentes radica en el hecho de si se usan como tales o si se usan unidas a otra proteína como anexo a la secuencia aminoacídica de ésta. Cuando se expresan como tal en un determinado tipo celular funcionan normalmente como un mero colorante vital que permite visualizar un subtipo celular *in vivo*. Cuando se usan fusionadas a otra proteína pueden permitir, además, visualizar la función de la proteína a la que se ha unido. En este sentido, debemos recordar la gran ventaja que suponen el pequeño tamaño de la GFP y su compacta estructura que han permitido que la fusión de la proteína GFP, normalmente en el extremo carboxilo-terminal de otra proteína no modifique significativamente ni la función ni la localización subcelular de la proteína nativa a la que se ha unido.

Otra distinción es si se expresa GFP o una de sus variantes para simplemente para localizar su presencia o si se usan formas modificadas que florecen de distinta forma o son más o menos estables según el momento metabólico de la célula. Esta última variante resulta ser un indicador funcional y ha tenido múltiples aplicaciones biotecnológicas. Así, se han generado bacterias que expresan las proteínas fluorescentes sólo en presencia de determinados contaminantes como el arsénico o los metales pesados (18). Dichas bacterias son de gran utilidad pues son una forma rápida y económica de comprobar si aguas de pozo están o no contaminadas antes de destinarlas al consumo humano.

En cualquier caso, todo empieza por transferir la secuencia de ADN que codifica por la proteína fluorescente a la línea celular u organismo que se quiera marcar. Esto se hace por técnicas estándar de trans-

fección y/o de generación de plantas y animales transgénicos. En el caso de la transgénesis, la expresión puede tener lugar en unos tipos celulares o en otros dependiendo de la secuencia promotora que se emplee. El promotor es la región de ADN genómico que antecede a la región que se transcribe a ARN mensajero y que tiene los elementos de secuencia para reconocimiento por distintos factores de transcripción que hace que ese mensajero se exprese en determinados tipos celulares y no en otros y, en muchos casos, que además se exprese en mayor o menor medida según el momento fisiológico de esa célula.

Una primera aplicación muy general ha sido en el campo de la investigación de los trasplantes de células incluidos los de células madre. En este tipo de experimentos se desea poder cuantificar el grado de implantación y colonización de las células exógenas dentro del huésped así como los subtipos celulares que se han originado. En este sentido, los ratones transgénicos que expresan EGFP bajo el control de un promotor ubicuo (que se expresa en todo tipo celular) y constitutivo (que se expresa en todo momento de la vida de una célula) como el de la beta-actina se han convertido en la cepa de ratones de elección para preparar células para experimentos de trasplantes. Las células exógenas se distinguen fácilmente en la sangre y tejidos sólidos del ratón receptor sin necesidad de fijar ni permeabilizar gracias a la fluorescencia de la GFP.

Respecto a la utilidad de expresar GFP fusionada a otra proteína, esto da información de tanto de los tipos celulares que expresan la proteína como de la localización subcelular de la proteína objeto de estudio. Esto es especialmente interesante cuando se generan modelos animales de enfermedades por expresión ectópica de una proteína patogénica. Así, por ejemplo en el caso de la enfermedad de Huntington que está causada por una mutación que resulta en una secuencia anómalamente larga de poliglutamina en la proteína huntingtina (Htt) y que hace que ésta autoagregue (19, 20), ha sido muy útil la inserción de GFP en la secuencia de la Htt mutada. Esto permite monitorizar el nivel de expresión de la proteína patogénica en los distintos tejidos a lo largo de la edad del animal así como la formación y localización subcelular de los agregados proteicos aberrantes. Un ejemplo de esto es la reciente generación del primer modelo transgénico en primate de una enfermedad humana por expresión de una forma mutada de Htt fusionada a GFP (21, 22).

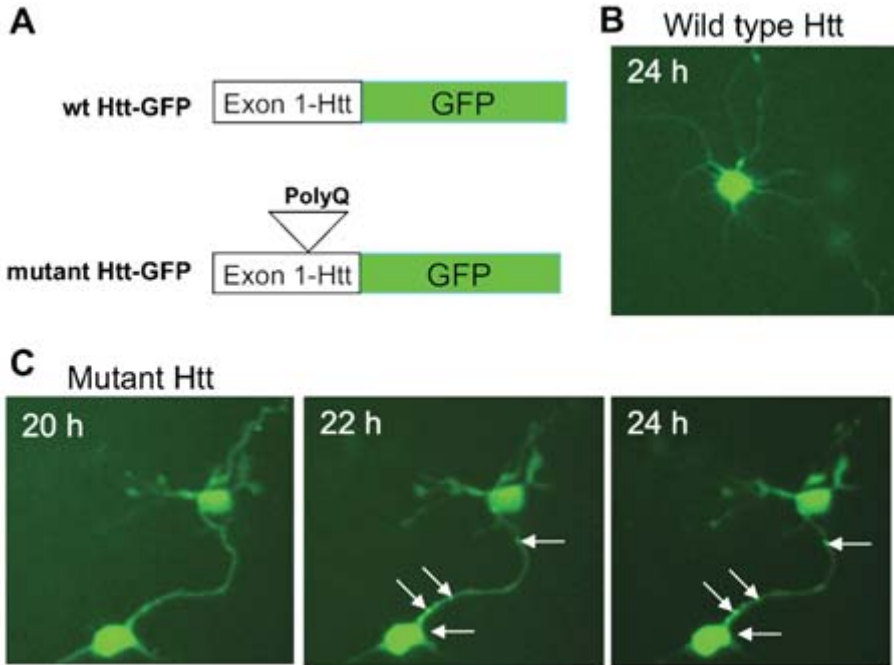


Figura 2. Experimentos de transfección de cultivos primarios de neuronas de ratón con formas de huntingtina marcadas con GFP para visualizar la formación de los cuerpos de inclusión característicos de esta enfermedad neurodegenerativa. **A)** Construcciones de ADN para expresar en experimentos de transfección la porción de Huntingtina (Htt) codificada por el exón 1 y fusionada a GFP, ya sea la forma silvestre (wt) o la mutada con una expansión de poliglutamina (mutant). **B)** Neurona expresando forma wt a las 24 horas de haber sido transfectada. **C)** Dos neuronas transfectadas con la forma mutada a distintos tiempos post-transfección. En la neurona inferior es posible visualizar la formación de los agregados de Htt mutada característicos de la enfermedad de Huntington.

También hay ejemplos de uso de proteínas fluorescentes modificadas como biosensores en combinación con su uso en modelos animales transgénicos para estudio del mecanismo patogénico de enfermedades neurodegenerativas. Una hipótesis prevalente en la enfermedades neurodegenerativas en general y en la enfermedad de Huntington en particular es la de que los agregados proteicos aberrantes que se observan en el interior de las neuronas pueden ser tanto causa como indicación de un mal funcionamiento del sistema ubiquitina proteasoma. El sistema

ubiquitina proteasoma se encarga del recambio por degradación endo-proteolítica de la mayoría de las proteínas solubles intracelulares cuando estas presentan señales para su degradación. La señal en concreto es la unión covalente de varias copias de una pequeña proteína de 76 aminoácidos denominada ubiquitina. Cuando una proteína contiene esta señal de poliubiquitinación es eficientemente degradada por el complejo multiprotéico y multicatalítico denominado proteasoma (23). Se han generado formas de GFP con modificaciones que hacen que la proteína fluorescente se poliubiquitile muy eficientemente. Por tanto, estas proteínas son rápidamente degradadas por el proteasoma y tienen un vida media extremadamente corta (24). Cuando los genes que codifican por estas formas de GFP se expresan en una célula, la proteína no se llega a acumular y por tanto la célula no muestra fluorescencia a no ser que el sistema ubiquitina-proteasoma no esté funcionando correctamente. Estas proteínas son pues biosensores de inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma. Para explorar la hipótesis de que un mal funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma en la enfermedad de Huntington estamos combinando nuestro modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Huntington (25, 26) con ratones con expresión ubicua de una de estas formas de GFP reporteras de inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma generadas por nuestro colaborador Nico Dantuma del Karolinska Institutet (27). De entre los distintos abordajes experimentales posibles para explorar la posible inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma en la enfermedad de Huntington, este posee numerosas ventajas y muy en particular la resolución celular a la hora de detectar si dicha inhibición está teniendo lugar sólo en un subtipo neuronal o sólo en un momento muy concreto de la evolución de la enfermedad (28).

Por último, una aplicación reciente y probablemente la más espectacular de las proteínas fluorescentes es el denominado experimento "*brainbow*" (29), por el juego de palabras inglesas *brain* (cerebro) y *rainbow* (arco iris). Lo que hicieron Livet y sus colaboradores de la Universidad de Harvard (USA) fue generar ratones modificados genéticamente que incorporaban en sus genomas las secuencias de ADN que codifican tres de estas proteínas fluorescentes. Concretamente, una azul-cian, otra amarilla y otra roja. Por la manera en que se generó este ratón transgénico, cada neurona de éste expresa una cierta proporción de cada una de estas tres proteínas. De esa forma, al igual que ocurre al combinar las tintas de una impresora, cada neurona fluoresce-

ce en un color determinado del arco iris ligera o totalmente distinto del que exhibe la neurona vecina. Gracias a este experimento ha sido posible observar por primera vez la intrincada complejidad de todas las proyecciones neuronales simultáneamente.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Nobel-Foundation. (2008) The Nobel Prize in Chemistry 2008. *The Royal Swedish Academy of Sciences* www.kva.se.
2. Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-239.
3. Shimomura, O. (1995) A Short Story of Aequorin. *The Marine Biological Laboratory Biological Bulletin.* 189: 1-5.
4. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111: 229-233.
5. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263: 802-805.
6. Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. & Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 2122-2127.
7. Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 12501-12504.
8. Service, R.F. (2008) Three Scientists Bask in Prize's Fluorescent Glow. *Science.* 232: 361.
9. Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273: 1392-1395.
10. Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 104: 220-222.
11. Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. & Ward, W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry.* 32: 1212-1218.
12. Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature.* 373: 663-664.
13. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. & Tsien, R.Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388: 882-887.
14. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 2135-2140.

15. Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969-973.
16. Heikal, A.A., Hess, S.T., Baird, G.S., Tsien, R.Y. & Webb, W.W. (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 11996-12001.
17. Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 7877-7882.
18. Roberto, F.F., Barnes, J.M. & Bruhn, D.F. (2002) Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta.* 58: 181-188.
19. Gusella, J.F. & MacDonald, M.E. (1995) Huntington's disease. *Semin. Cell Bio.* 6: 21-28.
20. Martin Aparicio, E. & Lucas Lozano, J.J. (2002) Molecular basis of Huntington's disease and possible pathogenic mechanisms. *Rev. Neurol.* 35: 212-220.
21. 2008. Transgenic primate models inch forward. *Nat. Neurosci.* 11: 729.
22. Yang, S.H., Cheng, P.H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.J., Cheng, E.C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., et al. (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature.* 453: 921-924.
23. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82: 373-428.
24. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M. & Masucci, M.G. (2000) Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat. Biotechnol.* 18: 538-543.
25. Diaz-Hernandez, M., Torres-Peraza, J., Salvatori-Abarca, A., Moran, M.A., Gomez-Ramos, P., Alberch, J. & Lucas, J.J. (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 25: 9773-9781.
26. Yamamoto, A., Lucas, J.J. & Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell.* 101: 57-66.
27. Lindsten, K., Menendez-Benito, V., Masucci, M.G. & Dantuma, N.P. (2003) A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat. Biotechnol.* 21: 897-902.
28. Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M. & Lucas, J.J. (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2245-2257.
29. Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 450: 56-62.

*** Información de contacto:**

Dr. José J. Lucas.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC/UAM.

C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049 Madrid.

Tel 91 196 4552 / 91 196 4582. Fax 91 196 4420.

E-mail: jjlucas@cbm.uam.es

<http://www.cbm.uam.es/lineas/joselucas.htm>

<http://www.ciberned.es/grupos/joselucas.aspx>

SESIÓN NECROLÓGICA

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Gregorio Varela Mosquera

Sesión celebrada el 8 de mayo de 2008



El Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera nació el 8 de octubre de 1919 en La Coruña. Tomó posesión como Académico de Número el día 12 de junio de 1975. Falleció el 23 de noviembre de 2007. La Sesión Necrológica se celebró el día 8 de mayo de 2008. En dicha sesión participaron el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz, Académico de Número y el Dr. D. Salvador Zamora Navarro, Catedrático de Fisiología en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

In memoriam del Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera

Manuel Domínguez Carmona

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El exlibris de Marañón decía: “Si la pena es grande se la mata”. Empiezo mi disertación matando, metafóricamente, la pena que a todos nos embarga por la ausencia del Prof. Varela Mosquera, ausencia que es el precio que pagamos por haber sido y agradeciendo a nuestra Directora la profesora Miras y a la Junta de Gobierno haberme designado para participar con los profesores Zamora y Sanz, en la Necrológica de nuestro amigo y compañero el Académico Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera. Un agradecimiento más hondo, por el deseo expresado por su viuda la profesora Moreiras y por su hijo el Prof. Varela Moreiras de que interviniera yo en este acto.

La vida es un proceso que termina en apoptosis, pues nuestra muerte está programada, decidida desde que se produjo el asombroso acontecimiento de que dos células de diferentes procedencias y propiedades, se fusionaran, en el interior de nuestra madre.

La aceptación de que lo que no percibimos de algún modo no existe, constituye un error de método. Los hombres no percibimos lo que queda de un ser humano cuando muere, pues carecemos del sentido que nos permitiría percibirlo; pero el ser humano, la persona, no se extingue con la muerte, sino que se transforma.

Nuestra Presidenta hace pocos días, con ocasión de la Necrológica del Prof. Primo Yúfera, nos destacaba que estos actos contenían aspectos alegres, pues recreaban al ser no desaparecido, sino transformado de forma que lo hace imperceptible para nuestros sentidos, pero también imperecedero.

El Prof. Sanz íntimo amigo y compañero del Prof. Varela, en las cercanías docentes de sus respectivas disciplinas, coordinador de esta sesión, me encargó que glosara la personalidad del prof. Varela, Académico

con el número 3 de nuestro escalafón, como “Comunicador de la Ciencia”, a cuyo cumplimiento he escrito torpemente estas pensamientos.

En la comunicación humana, que es cultura, intervienen estos elementos: el mensaje, el mensajero, es decir el comunicador y el receptor del mensaje. Detengámonos un poco en estos puntos.

1º El mensaje

Para comunicar hay que disponer de lo que se desea transmitir. El mensaje científico que el Prof. Varela ha elaborado durante su vida ha sido la Nutrición. La nutrición que es biología que se nutre o alimenta, valgan las redundancias, de los alimentos. Pero también, es sociología y psicología. Lo que más saudade, causa al emigrante, después de sus seres queridos, tal vez de una canción, o de un paisaje, es una determinada comida que no tiene porqué ser la más exquisita que haya comido, pero es la que preparaba su madre y que tomaba la familia. Los antiguos espartanos gustaban de unas sopas que parece ser que aborrecían los demás griegos, pero era la que habían comido sus ancestros. La nutrición, el objetivo esencial de la alimentación, es la actividad a la que con la autoestima y la sexualidad, dedicamos, los humanos, la mayor parte de nuestra energía; pero aún hay más; el prof. Ortega Mata nos enseñó hace años en esta casa, la relación entre la alimentación y la farmacología y hasta los genes cuya estructura se creía inmutable, la epigenética ha demostrado que la nutrición, puede modificar la estructura y la expresión de los genes. Así la nutrición es esencial en el hombre y en su evolución. Ya se había dicho que el “comer hace al hombre” y un proverbio dice que «de lo que se come se cría». Además en la nutrición podemos encontrarnos con la metafísica. El hombre, como ser vivo tiene una estructura, a la que la bioquímica contribuye y mueve. Un coche funciona gracias a la energía que libera la combustión de la gasolina, pero solo después de que la chispa del contacto haya iniciado esa combustión. Miller solo logró sintetizar metano a partir de carbono y de hidrógeno mezclados en un matraz cerrado, hasta que le aplicó una descarga eléctrica. Es decir la vida además de bioquímica, de fisiología y de sociología, requiere algo que se nos escapa, ese algo que

reunió partículas, para formar núcleos, que a su vez formaron átomos y estas moléculas y así sucesivamente. Ese algo que en el mito clásico de Pigmalión fue el beso enamorado que transformó a una estatua en una mujer, o el soplo de Jehová que convirtió a una masa de barro en hombre. Ese impulso inicial de la vida, luego se perpetúa en la reproducción, en la que toda célula procede de otra célula, transmitiendo el impulso primigenio. "Omnis celula est celula" como enunció Virchow. La célula, la unidad de la vida, cuya reunión anatómica y funcional, determina una nueva realidad de la vida el ser vegetal o animal. Una vez puesta en marcha, la biología necesita aportes, que adquiere del ambiente, es decir de fuera de nosotros, ambiente en el que están la gravedad y las radiaciones, pero sobre todo la nutrición, es decir el conjunto de los procesos de ingestión, absorción, transformación y utilización de los alimentos por el organismo para formar nuestra estructura y darnos la energía necesaria para las funciones de homeostasis, de crecimiento y reproducción, funciones que la evolución pacientemente ha ido desarrollando en una compleja y prodigiosa red de reacciones.

Todos los que estamos aquí, hemos hecho investigación pero quiero destacar la gran diferencia entre la investigación básica en la que se trabaja con clones de bacterias o de células o con camadas de animales todos iguales en los que se observa las modificaciones que el diseño de la investigación desea conocer, para lo que deja bacterias, células animales como controles, pero traspasar la investigación a los estudios epidemiológicos, en los que los probandos no son homogéneos y a los que por razones éticas no se les puede someter a riesgos sino solo observar lo que ocurre naturalmente. A esto añadamos las dificultades inherentes a tener que tomar los datos a través de las informaciones de las personas que forman el estudio. Gran parte de las investigaciones del Prof. Varela y de su grupo investigador, en el que armoniosamente se integra su familia, ha sido conocer lo que las personas, las familias, comen. Yo he querido hacer alguno de esos estudios, la mayoría coronados con el fracaso; el que me dejó más herida, fue el proyecto de conocer la parasitación con nematodos de los habitantes de una aislada comarca gallega que carecía de retretes, a cuyo fin solicitábamos no dinero, ni tiempo, ni información directa etc., sino solo un pequeño fragmento de heces, metidas en un frasco que les suministramos junto con una espátula para su recogida, asegurándoles

el suministro gratuito de la medicación a las personas parasitadas. No pudimos conseguir las “valiosas muestras” de aquella población, porque nos faltó comunicabilidad. Para hacer encuestas alimentarias para conocer lo que comen las personas, hay que revisar la despensa, indagar cómo preparan las comidas, pesar los desperdicios etc., datos que el prof. Varela con sus colaboradores, conseguían con facilidad. Era la comunicabilidad de la que yo evidentemente adolecía.

En el caso del Prof. Varela, el mensaje que ha comunicado durante toda su vida, es múltiple, mejor dicho proteico, pero quiero destacar como resumen de todos ellos, la llamada “Dieta mediterránea” cuyos beneficios conoce todo el mundo y aunque una cosa es saber y otra cumplir, el conocimiento universal de esa dieta ha mejorado la salud de la población más que mil medicamentos.

2º Receptor del mensaje

El éxito de la comunicación es que el mensaje se haya integrado en los destinatarios. La comunicación humana no supone fotocopiar el mensaje en el cerebro. El receptor del mensaje debe incorporarlo a su persona debe aprehenderlo y hacerlo propio.

Para lograr esa integración hay que sazonar el mensaje, hacerlo interesante. Paradoja o boutade solo el que sabe aprende. El interés para el receptor es la coincidencia con los intereses y motivaciones del receptor. Un ejemplo: recordamos más fácilmente lo que nos deben que lo que debemos y el mal que nos han hecho que el que hacemos. Los docentes utilizamos las calificaciones para motivar a los alumnos.

La integración es un mecanismo también biológico o si se quiere psicológico, para lo que se requieren dos hechos.

El primero es que llegue el mensaje al cerebro, desde las antenas que son los sentidos, que transmiten la información a los axones de las células piramidales de Purkinje de la corteza prefrontal, asociada al razonamiento, y segundo, es imprescindible que llegue simultáneamente o casi simultáneamente al cerebro, otro tipo de estímulos, no captados por los sentidos, sino a través de otra vía nerviosa, la motivación del receptor.

El interés del receptor se relaciona más que con la recompensa, que puede ser el placer de aprender, con la anticipación de la recompensa y con la incertidumbre en lograrla. La importancia de ese interés fue comprobado en la Universidad de Emory, durante las elecciones de 2004 en EEUU, al encontrar que cuando hablaba el candidato preferido, las imágenes de resonancia magnética funcional, mostraban que se activaba la corteza frontal orbital, relacionada con las emociones, en los votantes de su partido. El circuito nervioso de Papez comprende el sistema límbico y el hipocampo, en donde radican con los instintos las emociones, nuestros interés y motivaciones.

Entre los estímulos ajenos al contenido del mensaje, figuran el ambiente en el que se desarrolla la comunicación como su confort y su belleza, pero el activador esencial de esa vía es la personalidad del comunicador. En este punto el Prof. Varela tenía Matrícula de Honor. Gregorio era un comunicador nato, aunque no lo supiera, ni quisiera. Como el personaje de nuestra literatura que hablaba en prosa sin saberlo. Tenía el don de la alegría, de lo lúdico. Es fácil estar alegre en las fiestas, pero lo importante es ser alegre en las contrariedades y en el trabajo, aunque éste como dice su etimología conlleve *tripalium*. Este año de 2008, se ha querido instituir el 1 de abril como Día Internacional de la Diversión en el Trabajo. El trabajo, no debe ser ocasión de diversión y menos de charlotada como parece que se ha desarrollado, pero sí de alegría. Los griegos encarnaban en la “areté” la totalidad de la persona, su calidad, su clase diríamos hoy, La areté del Prof. Varela era extraordinaria; tenía gracejo, un modo de hablar peculiar, algo entrecortado, propio del que quiere transmitir a más velocidad de lo que permite la fisiología fonatoria, un magnífico sentido del humor que juega un papel decisivo, sentido del humor que habría crecido en la trayectoria del Prof. Varela por la piel de toro, Galicia, Granada, Madrid. Esta alegría y este humor dejaban ausentes la monotonía y sobre todo el aburrimiento. Además Varela tenía talento, aquello que Flaubert, consideró que era una larga paciencia, entusiasmo, simpatía y optimismo porque infundía ilusión, entusiasmo, vocación y pasión. Tenía “la conciencia tranquila y la inteligencia intranquila” como aconsejaba Neruda.

La capacidad de comunicar es el resultado de múltiples pertenencias, como la de tener una profesión, un ideario, una religión, una ge-

neración, un equipo de fútbol. La pertenencia a una tierra forma parte de la personalidad, que no depende como pueda parecer del hecho de haber nacido en un determinado territorio, ni de haber vivido mucho tiempo en uno determinado, sino de haber recibido y aceptado, como hace una planta de la tierra que lo sustenta los nutrientes de su personalidad. Gregorio era gallego, había nacido en Galicia y vivió su infancia y juventud en Galicia, se notaba en los acentos de su voz, en los modismos de sus palabras, en su pragmatismo, en su bonhomía y en su sensatez.

Ser gallego no quiere decir que se desprecie o se ignore a los que no lo son, ni siquiera sentirse como tal, como quiere el sentimentalismo nacionalista, sino un modo de insertarse en la humanidad. Para Gregorio, para mí y para muchos el territorio es el vehículo para ayudar a los demás habitantes del planeta Tierra, para ser hermano de los demás. Por muchos millones de años que hayan transcurrido toda la humanidad ha tenido un antepasado común o tal vez dos. No podemos conocer, ni ayudar y menos aun amar a todos los individuos de la humanidad, hemos de achicar nuestro ámbito como el astrónomo achica su campo de observación, ampliando lo que motiva su interés, y en el caso al que me refiero, haciéndolo próximo, es decir prójimo, en primer lugar a nuestra familia, después a nuestro pueblo, a nuestra región (no digo autonomía que es concepto administrativo), a nuestra patria, a nuestra ámbito cultural, el democrático y cristiano de Occidente pero repito que lo fundamental son los demás, los otros seres humanos y así en este sentido era gallego nuestro amigo Gregorio.

El Prof. Varela tenía carencias importantes, no tenía pereza, ni desánimo, ni amargura, ni egoísmo. Gregorio Varela era un hombre generoso que se daba a todos y lo hacía ampliamente, hasta con estruendo. Hoy se concede la generosidad a una gran longitud del gen AVPRI descubierto en 2005 que al expresarse posibilita que la vasopresina genere satisfacción cuando se crean vínculos sociales y afectivos y cuando se actúa con altruismo. Pero ese mecanismo genético nos predispone pero no nos rige ya que está sujeto a nuestra voluntad. Gregorio era generoso aunque su AVPRI fuera corto. Todo ello condujo al prof. Varela a ser un maestro en el que concitaba la sencillez con el rigor, temple, entusiasmo, responsabilidad y brillantez.

3º La transmisión del mensaje.

Los antropoides primitivos apenas se comunicaban, solo transmitían avisos de amenazas pues carecieron durante millones de años de memoria, que lenta, muy lentamente se fue desarrollando. La memoria incipiente proporcionó códigos de señales, gestos y sonidos articulados que permitieron comunicar a otros congéneres información, ideas y hasta sentimientos. Este hecho hizo que las plantas, los animales y las cosas tuvieran realidad, porque tenían nombre.

Los mensajes se solificaron en la piedra o en el barro cocido mediante ideogramas, símbolos visuales que posteriormente pasaron a símbolos fonéticos, a fonemas, con la escritura sobre soportes de pergamino, papiro o papel que fijaron la palabra, a la que la imprenta hizo perdurable y que la radio y la televisión globalizaron apoyados por la moderna tecnología informática. Refiriéndose a la escritura, que se debe extender a todos los medios, Platón exclamaba “¡Apariencia de sabiduría y no sabiduría procuras a tus discípulos, que habiendo oído hablar de muchas cosas sin instrucción, darán la impresión de conocer muchas cosas, a pesar de ser en su mayoría unos perfectos ignorantes...!”

La transcriptación de los sonidos emitidos por la garganta en un código, es decir, en palabras, es un logro de la humanidad que forma el mensaje, símbolo fonético, que encierra el significado de lo que la palabra pretende transmitir. El ideal de la palabra es que defina completa y exactamente la realidad. No estoy de acuerdo con Borges cuando quería que en las letras de la palabra rosa estuviera la rosa misma, pues ello significaría magia. Sí asumo estos versos de Juan Ramón Jiménez que reproduzco aquí conservando su peculiar ortografía:

*¡Inteligencia, dame el nombre exacto de las cosas!
Que mi palabra sea la cosa misma, creada por mi alma nuevamente.
Que por mí vayan todos los que no las conocen a las cosas;
que por mí vayan todos los que ya las olvidan, a las cosas;
que por mí vayan todos los mismos que las aman, a las cosas...
¡Inteligencia, dame el nombre exacto, y tuyo, y suyo, y mío, de las cosas!».*

Al Prof. Varela su inteligencia, ahora con la letra “g”, le había otorgado el don de dar el nombre exacto a lo que quería decir, de

modo que su discurso era claro e iba directo a su fin; quien oía sus palabras, sabía lo que había dicho. La comunicación de lo que se ha descubierto, pensado o hasta creído, nos hace, más que individuos, partes de ese conjunto formado por los otros, por los demás formando una red de comunicación en la que cada uno de nosotros, somos nudos de esas redes, semejante a la que forman las vías de señales en el citoplasma. Se ha constituido una nueva unidad, que es la Humanidad en la que no nos diluimos, sino en la que seguimos siendo personas, responsables y sin que nada humano nos sea ajeno. Esta unidad hace que la Humanidad, no sea una anécdota sino una unidad que en lo religioso se eleva a la “comunidad de los santos”.

Si en el contenido del mensaje es importantísimo, su comunicación por la palabra, sigue siendo básica. El Prof. Varela conocía y manejaba el español con naturalidad, con precisión y con belleza. Es grave, yo diría terrible, la corrupción del lenguaje especialmente en los jóvenes, es decir en los educadores del inmediato futuro. La comunicabilidad de Gregorio era libre, espontánea, acompañando a su verbo sus movimientos y sus gestos. Sabía despertar la curiosidad y el espíritu crítico y mostraba la utilidad, los beneficios, en suma la recompensa, que para los que recibían sus mensajes reportaría el haber apresado, aprendido su contenido.

El Prof. Varela presentaba su mensaje de un modo perfecto para que pudiera ser recibido de forma clara, sin posibilidad de errores con un lenguaje claro pero sobre todo con libertad, valor espiritual, en el que se basa la moralidad. Para Kant, el imperativo de la moralidad era también el de la libertad, que nos permite escapar al determinismo de la naturaleza humana. La trascendencia de la libertad espiritual cuando se comunica Ciencia, da seguridad al contenido del discurso, que para Varela no estaba coartado por ninguna circunstancia sino por sus propios criterios. Esta libertad en la transmisión de la Ciencia de Varela era enormemente eficaz para destacar sus mensajes pero aún más importante es que comunicaba la trascendencia social de la libertad y dentro de ella en la salud, el objetivo de todos nosotros, de nuestra Academia pues la libertad es un componente imprescindible de ese estado de bienestar al que Stampar, equiparaba la Salud y que por su importancia retomó la OMS en el Preámbulo de su Constitución.

Más importantes que sus clases y conferencias en esta casa, es su contribución a la amistad. No se si lo recogen nuestros Estatutos, pero sin duda un resultado de nuestra pertenencia a la Real Academia Nacional de Farmacia es la amistad que se fragua entre nosotros. En esa tarea, también el Dr. Varela ha sido un catalizador extraordinario. No hace falta que Cicerón en su Tratado sobre la amistad dijera que “Un amigo es un segundo yo”. En esta casa somos amigos, no solo los Académicos, sino todos los que aquí trabajan, y los que asisten a nuestros actos. Gregorio infundía amistad por todos sus poros, su risa, su semblante abierto, y su modo de hablar. Hemos de recoger ese espíritu de Gregorio e incorporarlo a la Academia, y especialmente a las “tertulias” de Antonio Martínez.

Recordemos ahora el futuro aunque Hawking, el famoso físico inglés negara esa posibilidad. No concibo un Cielo de felicidad perpetua, ni la quiero para mí, sin nada que hacer, sin amigos. Pero sabemos que en el Cielo hay numerosas estancias, en alguna de las cuales los jueves me gusta anticipar que habrá Sesiones científicas, algunas tardes tertulias y siempre amistad. Habrá un sillón 29, de nuevo ocupado por el Prof., Varela. A la inmortalidad de la obra hay que añadir la del recuerdo de los discípulos, de los amigos y de la familia, pues como decía Eugenio D’Ors “las horas pasan, la vida pasa, solo queda la obra bien hecha” y la obra científica y personal del Dr. Varela está muy bien hecha.

Termino. He hablado de quien admirábamos y queríamos. He prestado a mi voz a lo que todos hubierais dicho mucho mejor, pero sé que en los sentimientos fraternales que exponemos públicamente aquí estamos todos abrazados.

Mi pesar confiado, que es el de la Real Academia de Farmacia a la familia del Prof. Varela a su viuda la Profesora Olga Moreiras, amiga y compañera tan querida y admirada en esta casa. Un matrimonio unido por una vocación semejante, la alimentación proceso indisolublemente unido al contiguo de la nutrición y por el Amor. Nuestro sentimiento a Gregorio, hijo del Prof. Varela Moreiras, Catedrático de la Universidad San Pablo CEU quien fue mi decano, en la polimorfa Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, antes de que se disgregara en varias Facultades entre ellas las de Farmacia, Medicina, y la de Tecnología y Ciencia de los Alimentos. De mi estan-

cia y convivencia en aquella Universidad con alumnos y profesores guardo un maravilloso recuerdo.

Asociamos por razones de contigüidad la muerte con el cadáver. Estamos equivocados. La relación del cadáver con la persona fallecida (tan importante para conocer la causa de la muerte) es la misma que la del traje que dejó en el armario. Ese cadáver se descompone y despersonaliza. En cambio el recuerdo, la recreación y la oración hacen que vivamos en los demás y los otros en nosotros. Yo doy existencia cuando veo, oigo, huelo, toco o simplemente percibo la presión del aire cuando se mueve alguien. Si yo no tuviera esas facultades ese imaginado otro no existiría. Pero si recreamos, juntos, a nuestros seres queridos, a nuestros compañeros de viaje en esta Academia, los estamos dando igualmente vida. Pienso que a Gregorio le gustará saborear los versos de su paisano Celso Melio Ferreiro:

*“Máis o lume que alampea
xamais o veredes morto”.*

He dicho.

SESIÓN NECROLÓGICA

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López

Sesión celebrada el 19 de octubre de 2008



El Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López nació el 5 de noviembre de 1921 en Madrid. Tomó posesión como Académico de Número el día 18 de noviembre de 1971. Falleció el 24 de enero de 2008. La Sesión Necrológica se celebró el día 19 de octubre de 2008. En dicha sesión participaron el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número, D. Rafael Lozano Fernández, Académico Correspondiente y el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo, Académico de Número. Fue presidida por la Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El Excelentísimo Señor Don Antonio Doadrio y la química inorgánica de la segunda mitad del siglo XX

Francisco Javier Puerto Sarmiento

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excelentísima Señora Presidenta.

Excelentísimas señoras y señores Académicos.

Querida familia de D. Antonio Doadrio.

Señoras y señores.

Es para mí un honor el haber sido designado por esta Real Academia Nacional de Farmacia para participar en la Sesión Necrológica de quien fue destacado miembro de ella, y uno de los grandes y prestigiosos maestros con quienes me formé en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Desgraciadamente quedan ya muy pocos de los profesores de nuestra época. Participar en el recuerdo y homenaje de éste, que tanto sobresalió, me produce una singular satisfacción.

Quiero agradecer también a su hijo, el Excelentísimo Señor Don Antonio Doadrio Villarejo, Secretario de esta institución, compañero de promoción y del servicio de armas, aunque algo más joven que yo, su amable ayuda en la preparación de este texto.

FARMACIA Y QUÍMICA

La química, en todos los lugares del mundo y de manera muy especial en España, ha tenido un desarrollo muy ligado a la farmacia.

Los farmacéuticos, por imperativo profesional, han buscado fármacos en toda la naturaleza; en principio, botánica, química, zoología y mineralogía fueron disciplinas importantes para nosotros.

En España, además, un proceso muy tardío e incompleto de industrialización hizo que quien estuviera interesado en la química, apenas encontrase otra manera de ganarse la vida distinta al ejercicio profesional farmacéutico (1).

Si buscamos entre los principales químicos ilustrados españoles nos encontramos con Pedro Gutiérrez Bueno, catedrático de Química del Real Laboratorio de la Corte, introductor temprano de la nomenclatura de Lavoisier y ejerciente de la farmacia en oficina (2). El traductor del tratado químico de Lavoisier, Juan Manuel Munárriz, fue capitán de Artillería –otra de las maneras posibles del ejercicio de la química aplicada a la metalurgia o a la preparación de pólvora- y discípulo de Proust en Segovia (3). El tercero sería el beliforano Domingo García Fernández (4), quien se encargó de los asuntos de química en la Junta de Comercio, las reales casas de moneda y las reales fábricas de salitre. Sin ser farmacéutico, se le permitió llevar la botica de la Reina Madre en la madrileña calle Mayor.

La íntima conexión se observa en los primeros títulos, otorgados a partir de las *Ordenanzas de Farmacia* de 1800. Los colegios de la Facultad Reunida les concedían la consideración de Bachilleres en Química. Tras unas prácticas en oficina de farmacia, la Junta Superior Gubernativa de Farmacia les proporcionaba el grado de Licenciado en Farmacia y, de nuevo en la Facultad Reunida, podían conseguir el título de Doctores en Química (5).

Incluso los primeros profesores de química en la facultad de ciencias, fueron en su mayoría farmacéuticos. Por eso la doble titulación estuvo y sigue estando presente en muchísimos de nuestros más destacados profesores.

LOS CAMINOS DE LA QUÍMICA

Mucho antes del nacimiento de Don Antonio Doadrio, la química estaba perfectamente estructurada y dividida.

Lavoisier había reconocido una idéntica configuración química entre los seres vivos y los inanimados, pero creía que en los primeros regían unas especiales leyes vitales. Jöns Jacob Berzelius, en el prólogo de su *Tratado de Química*, aceptaba su existencia, consideraba la enorme utilidad de su posible descubrimiento pero, ante la imposibilidad de llegar al

mismo, aconsejaba dejarlas de lado y proceder como si fueran inexistentes. De esa manera se emprendió la indagación química de los vegetales, los animales, se investigaron nuevos productos químicos y comenzó a desarrollarse la síntesis química, luego aplicada a la terapéutica.

A principios del siglo XIX se produjo el descubrimiento de los alcaloides y los glucósidos mediante una legión de investigadores que, no por casualidad, fueron en su inmensa mayoría farmacéuticos.

En 1828, Friedrich Wöhler, consigue sintetizar la urea y demuestra cómo una materia orgánica puede ser producida artificialmente, con lo cual se despejan muchas de las dudas planteadas por los diversos vitalismos y se abre un panorama inmenso para la química orgánica en su relación con la terapéutica (6).

Durante el siglo XIX la química se desarrolló en torno a dos teorías: el dualismo y el unitarismo.

La primera había sido enunciada en origen por Lavoisier y desarrollada por Berzelius, Liebig, Dumas y Fresenius. Para ellos, todo átomo posee una carga positiva y otra negativa, a excepción del oxígeno que sólo estaría cargado negativamente; de ahí el carácter dual.

A mediados de siglo se desarrolla la teoría unitaria a partir de la obra de Laurent, un discípulo de Dumas. Para él, la carga de los átomos no sería doble. A partir de esta nueva hipótesis, se desarrolla la teoría de valencia, la teoría atómica y molecular. Mendeleiev ordena la tabla periódica de los elementos en base a su valencia.

Al final del siglo se van sentando las bases de la separación entre la química inorgánica y la orgánica; se fundamenta en la presencia o no de átomos de carbono (7).

El siglo XX se caracteriza por el estudio de lo existente bajo la superficie del átomo: los electrones, la radioactividad, el número atómico, la resonancia, las capas electrónicas...

En esos temas estaba la química cuando el profesor Doadrio se inició a la vida científica.

En España habían sido estudiados, con especial acierto, en el Instituto Nacional de Física y Química, en donde destacaron químico-farmacéuticos de la talla de Moles o Madinaveitia (8).

LA CARRERA CIENTÍFICA DE DON ANTONIO DOADRIO

Los años de formación

Licenciado y doctor en farmacia, con premio extraordinario en ambos grados, fue también licenciado en ciencias químicas. Con ello se cumple en su persona esa tradición de intercambio científico entre la profesión que fue tronco original de su institucionalización y la rama dedicada más al conocimiento científico puro.

Acabó su carrera en el curso de 1939-40, es decir en uno de los peores momentos, por no decir el peor, de la vida científica en España. Se encontró con una nación en plena posguerra, con la universidad desmochada por el exilio forzado de muchos profesores –varios de ellos químicos y farmacéuticos-, sin posibilidad de formarse en el extranjero, debido a la autarquía impuesta por la guerra mundial y la política interna, y con el deber, luego logrado con esfuerzo y brillantez, de devolver la ciencia al nivel conseguido durante los años anteriores a la Guerra Civil.

Dentro de la tragedia tuvo la suerte y la habilidad de ponerse en la estela del profesor Ricardo Montequi, a quien acompañó durante prácticamente toda su andadura como catedrático de química inorgánica en Madrid y con quien redactó más de treinta publicaciones.

Para Montequi, el trabajo universitario se reducía a *unas ideas claras y elementales. Primero experimentar, experimentar a toda costa y tener opinión directa del mayor número posible de hechos. Después considerar la investigación como tarea obligatoria del Profesor universitario, sin la cual nunca podría llegar a ser buen maestro* (9). Como vemos, estaba en una excelente corriente intelectual.

No sólo eso, también supo entrar, aunque fuera desde la lejanía, en contacto con la escuela de Moles. Durante el curso 1943-44 se adscribió a la cátedra del Profesor Sellés como becario del CSIC. El profesor de Farmacia Galénica había realizado su tesis doctoral, dirigida por Enrique Moles, sobre un tema de química inorgánica (10). Allí, además de entrar en contacto con otros químicos, como Enrique Gutiérrez Ríos, seguramente se planteó la necesidad de hacer de la química inorgánica un instrumento al servicio de la preparación y el estudio de los medicamentos, lo cual llevaría brillantemente a efecto a lo largo de su carrera académica.

Efectuó su tesis doctoral sobre nuevos métodos de valoración de algunos metales en sus minerales. Acabada la Tesis se adscribe a la Cátedra de química inorgánica, primero como Ayudante de química inorgánica aplicada y luego como Auxiliar de química inorgánica analítica, además de obtener la citada beca del CSIC.

En 1958 recibe otra beca de la Fundación March para el estudio de minerales y productos metalúrgicos, acorde con su pertenencia al *Consejo Ordenador de los minerales estratégicos*.

Años antes (1952) obtiene por oposición una plaza de Profesor en el Laboratorio Municipal de Madrid, en donde organizó el servicio necesario para el control de la contaminación atmosférica. Lo abandonó al resultar incompatible con el ejercicio de la cátedra universitaria. Al tiempo se dedica a la investigación científica y se gana la admiración de su maestro con sus estudios sobre los quelatos de salicil-aldoxima, acetil-acetona y benzoil acetona.

Al jubilarse Montequi, en 1963, ganó la cátedra de química inorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, después de unas brillantísimas oposiciones, muy recordadas por sus maestros y discípulos, en donde ya aparece su vena innovadora.

De la química inorgánica a la química de coordinación

La preparación y la pertenencia de un profesor a su comunidad científica, nacional e internacional, puede detectarse muy bien a partir de la evolución de su concepto sobre la materia que investiga o profesa, y su adecuación a las corrientes internacionales paradigmáticas. En el caso de Don Antonio Doadrio se sigue perfectamente a través de sus intervenciones en esta Real Academia, tanto en su propio discurso de ingreso, como en los de contestación a varios académicos, y en los esbozos conceptuales de los libros que editó con fines docentes.

Buena parte de su programa para la oposición lo prepara de acuerdo con el texto de Cotton y Wilkinson (11), entonces muy novedoso en España, adentrándose en el terreno de la llamada química de coordinación.

El concepto de la misma lo explicó exhaustivamente en el discurso de ingreso en esta Real Academia (1971).

Para él, *la química inorgánica puede ofrecer gran interés en la interpretación de las reacciones biológicas y ya nadie se atrevería a calificarla sólo como la química del mundo mineral, pues son innumerables los compuestos de coordinación constituidos por iones metálicos.*

Según el profesor Doadrio, *decir química de coordinación es tanto como decir química inorgánica actual, más agresiva, con más garra investigadora y conceptual... en el contexto de una química unificada, relacionada con la química biológica y la química médica.*

Estas ideas las había esbozado ya en la lección magistral del año 1966, confiada a su cuidado por la Real Sociedad de Física y Química.

En el camino hacia el concepto de química bioinorgánica, en el año 1966, tradujo el texto de Clarence A. Discher (12).

Unas ideas muy similares iban a ser desarrolladas internacionalmente por D.R. Williams (13) y cristalizarían en el manual de Antonio Doadrio sobre Química bioinorgánica (14).

Química inorgánica y bioinorgánica: ciencia pura y ciencia aplicada

¿Cuál era su concepto sobre las disciplinas en las que fue maestro?

A mi juicio, -escribe-, sin el estado sólido, la química inorgánica perdería una de sus características más destacadas, y le sería difícil mantener su identidad peculiar.

En el campo de los compuestos moleculares inorgánicos y más particularmente si nos referimos a compuestos de coordinación y organometálicos, se desdibujan las fronteras que limitan la química inorgánica y la orgánica e incluso bioquímica, a través de la bioinorgánica...

Si bien consideraba necesario seguir apoyándose en los dos pilares tradicionales: *química de los compuestos moleculares y del estado sólido* (15).

Y, ¿cuál era su aplicación a la terapéutica?

En su discurso de contestación al Excmo. Sr. D. Antonio Mosqueira, escribe: *se ha de considerar que el objetivo primordial de todo medicamen-*

to es intervenir en un proceso biológico modificándole adecuadamente para el fin que se persigue o devolviéndole a sus condiciones normales si se encontrara alterado. Con ello adquiere un mayor significado el papel de la química inorgánica en el conocimiento de la función que puede ejercer el medicamento, ya que para la interpretación correcta de muchas reacciones biológicas hay que acudir a los conceptos teóricos y técnicas experimentales que proporciona la química de coordinación, lo que ha dado lugar a la aparición en estos últimos años de una nueva ciencia interdisciplinar, de desarrollo pujante: la bioinorgánica (16).

En definitiva, la química estudia *la composición y propiedades de la materia, así como las transformaciones que ésta experimenta, buscando como última finalidad un conocimiento básico del entorno material de los seres vivos...o una aplicación inmediata de los productos que la naturaleza nos ofrece y de aquellos otros obtenidos artificialmente mediante procesos químicos (17), y la bioinorgánica, la acción biológica que ejercen en los seres vivos los iones metálicos. La base teórica de ésta última es la química de coordinación, considerando las características peculiares de los ligandos que intervienen...y las estructuras también peculiares de los complejos que se forman (18).*

COROLARIO

En la actividad científica de Don Antonio Doadrio se observan tres características.

En primer lugar, una permanente pertenencia al paradigma científico de frontera, a lo más actualizado de la ciencia química de su tiempo.

Aunque no es objeto de este brevísimo estudio, se observa también en su actividad investigadora y directora de la investigación de tantos profesores, entre los cuales se han de destacar a dos de sus hijos, circunstancia que le produciría inmensas satisfacciones, y en su reconocimiento abundante por instituciones científicas y profesionales, nacionales e internacionales.

En segundo lugar, su afán permanente de innovación. A consecuencia del mismo se planteó la renovación de su programa docente completo en varias ocasiones. Con esta actitud testimonia su auténti-

co carácter universitario, su compromiso con sus alumnos y su amor hacia su propia disciplina.

En tercer lugar el permanente interés en hacer de su materia, la química inorgánica, algo útil para los farmacéuticos, situándose de manera inteligente en posición de interdisciplinaridad, excediendo los límites tradicionales de su ciencia, desde la búsqueda de la utilidad farmacológica de sus conocimientos. Esto lo hizo no como fue habitual durante el siglo XIX, en donde las ciencias aplicadas a médicos y farmacéuticos suponían una simple limitación de los conocimientos puramente científicos, sino ampliándolos desde la renovación y la visión multidisciplinar de su materia. Esta inteligente y avanzada postura requiere unos inmensos conocimientos, pero es extraordinariamente útil y atractiva.

No quedaría clara la figura científica del Profesor Doadrio sin dar cuenta de su extrema elegancia personal e intelectual. Él, como querían los hipocráticos, supo hacer y hacerlo bien, con armonía y belleza. Por eso, fueran cuales fueran los sentimientos personales del alumnado hacía él –siempre cambiantes en función de las notas- quedaba una invariable admiración y respeto. No es inútil recordar que sus clases estaban siempre abarrotadas, que no se necesitaban complementos docentes, recibidos fuera de las aulas, para superar su compleja disciplina, que hacía parecer fáciles las cosas complejísimas lo cual es testimonio de su sabiduría y que el mayor reconocimiento recibido –aunque el más fugaz– fue el de la admiración anual de quienes recibimos su docencia.

Doadrio fue un hombre talentoso, seguramente de nacimiento, pero supo multiplicar lo recibido, no sólo en el ámbito científico, también en el institucional y en el profesional. De todos ellos, el más impresionante al parecer de quien esto escribe, es el reconocimiento y la admiración de sus alumnos de cada curso.

La Real Academia Nacional de Farmacia ha de cuidarse de guardar la memoria de sus miembros. Lo hace desde la exposición objetiva de la excelencia profesional de quienes la componen, pero también debe sentirse especialmente satisfecha cuando alguno de los suyos, como el Profesor Doadrio, alcanzó también el cariño de sus alumnos.

El día de hoy es de tristeza por el académico que ya no podrá acompañarnos nunca más, pero también de alegría al ver una vida realiza-

da en plenitud y cómo puede ofrecerse la suya de modelo a las jóvenes generaciones.

Estas consideraciones apenas servirán de consuelo a sus más allegados, a sus familiares. Sus creencias, sin embargo, les ayudarán a soportar la ausencia y la certeza de haber convivido con un ser excepcional les debe llenar de orgullo, esperanza y alegría.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lafuente, A., Calleja, M. C. & Puerto, J. (1988) Los profesionales de la Sanidad tras su identidad en la Ilustración. En José Manuel Sánchez Ron. (ed.) *Ciencia y sociedad en España*. Madrid: Editorial El Arquero/CSIC, p.71-92.
2. Carrasco Jarabo, P. (1994) *Vida y obras de Pedro Gutiérrez Bueno*, Madrid: tesis doctoral inédita, dir. Guillermo Folch Jou, Universidad Complutense, 1961; Pedro Gutiérrez Bueno, *Método de la nueva nomenclatura química*. Estudio preliminar de Ramón Gago Bohórquez, Madrid: Fundación de Ciencias de la Salud.
3. Vernet, J. (1976) *Historia de la ciencia española*, Madrid: Instituto de España: cátedra Alfonso X el Sabio; reedición Barcelona: Alta Fulla, 1988.
4. López Piñero, J.M., Glick, T.F., Navarro Brotons, V. & Portela Marco, E. (1983) *Diccionario histórico de la ciencia moderna en España*, Barcelona: Península; vol. I, pág. 378.
5. Puerto, J. (1999) La enseñanza de la Química en España en torno a 1898. En Javier Puerto; María Esther Alegre Pérez; Mar Rey Bueno, (coords.) *1898. Sanidad y Ciencia en España y Latinoamérica durante el cambio de siglo*, Madrid: Doce Calles, pp. 161-175.
6. Asimov, I. (1975) *Breve historia de la química*, Madrid: Alianza.
7. Reol Tejada, J.M. (2006) *Homenaje a las grandes figuras de las ciencias farmacéuticas: Enrique Moles y Obdulio Fernández*, Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia/Fundación Casares Gil/Amigos de la Cultura Científica/Academia de ciencias e ingenierías de Lanzarote.
8. Montequí, R. (1971) Discurso de contestación, en Antonio Doadrio López, *La Química de Coordinación en la interpretación de las reacciones biológicas*, Discurso leído en la sesión del día 18 de noviembre de 1971 para su ingreso como Académico de Número y contestación por el Excmo. Sr. D. Ricardo Montequí y Díaz de Plaza, Madrid: Instituto de España, Real Academia de Farmacia, 1971, pág. 69. La biografía del Doctor Montequí en Rafael Roldán Guerrero, *Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*, Madrid: INPHOE, 1975, tomo III, pág. 403-409.
9. Doadrio López, A. (1983) Discurso de contestación. En Enrique Gutiérrez Ríos, *La química inorgánica en la segunda mitad del siglo*. Discurso leído en la sesión

- del día 3 de febrero de 1983 para su ingreso como Académico de Número. Madrid: Instituto de España, Real Academia de Farmacia, 1983, pág. 43.
10. Cotton, F.A. & Wilkinson, G. (1969) *Química inorgánica avanzada*, México D.F.: Limusa.
 11. Discher, C.A. (traductor Antonio Doadrio López) (1966) *Química inorgánica farmacéutica*, Madrid, Buenos-Aires, México: Editorial Alambra.
 12. Williams, D.R. (1971) *The metals of life. The solution chemistry of metal ions in biological system*, London, New York: van Nostrand Reinhold.
 13. Doadrio López, A. (1979) *Química bioinorgánica*, Madrid: LAEF.
 14. Doadrio López, A. Discurso de contestación. En Enrique Gutiérrez Ríos, *La química inorgánica en la segunda mitad del siglo*. Op., cit., pag. 50-51.
 15. Doadrio, A. (1974) Contestación al discurso. En Arturo Mosqueira Toribio, *La teoría de los orbitales moleculares y el diseño de nuevos medicamentos*, Madrid: Instituto de España/Real Academia de Farmacia, 1974, pág. 122.
 16. Doadrio López, A. (1982) *Química general*, (4ª ed.) Madrid: COPYRECORD, pág. 1.
 17. Doadrio López, A. (1984) *Química bioinorgánica*, (3ª edición, 4ª reimpresión), Madrid: COPYRECORD, pág. 3.

Homenaje a Don Antonio Doadrio

Rafael Lozano Fernández

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Sra. Presidenta de la RANF.

Excmas. Sras. Académicas

Excmos. Sres. Académicos

Ilustrísimas Sras.

Ilustrísimos Sres.

Sras. y Sres.

Querida M.^a Rosa, hijos y familiares.

En primer lugar, deseo agradecer la oportunidad que me han dado los organizadores de esta sesión necrológica, para hablar del Prof. Doadrio López, Don Antonio para todos los que compartimos con él tantos años, pues para los grandes Maestros, los títulos académicos son innecesarios.

El día que me lo ofrecieron, no dudé ni un instante en aceptar el ofrecimiento, aunque en mi interior coexistieran diversos sentimientos contradictorios. Por un lado, preocupación, pues tener que hablar de mi Maestro, D. Antonio, y en sólo 10 minutos resumir los casi 20 años que he tenido la suerte de compartir con él, era una misión que se me antojaba harto difícil. Por otro lado, orgullo por haberme ofrecido tan inmerecido honor, pues no conseguía, ni aún hoy consigo, encontrar algún motivo de esta elección en mi humilde persona. Quizás sea por ser yo el penúltimo doctorando al que dirigió directamente la Tesis Doctoral, el último fue su hijo el Prof. Dr. D. Juan Carlos Doadrio, pues las restantes fueron dirigidas por los miembros de la Cátedra, bajo su dirección general, pues D. Antonio quizás consideró que había llegado nuestro momento y debíamos comenzar a independizarnos.

A diferencia de la mayoría de mis compañeros de la Cátedra de Química Inorgánica y Analítica como se denominaba anteriormente,

yo no fui alumno de D. Antonio en la Licenciatura, pues cuando ingresé en la misma, ya había finalizado mis estudios de Ciencias Químicas.

Conocí a D. Antonio en 1975, cuando por mi amistad con su hijo el Prof. Dr. Antonio Luis Doadrio, hoy Secretario de esta Docta Academia, le fui a recoger a la Facultad y me estuvo enseñando la Cátedra y me presentó al “jefe”.

Por esas fechas, yo era Profesor Encargado de Curso en horario de tarde en el Departamento de Química-Física de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM. Impartía clases de Bachillerato nocturno en el colegio JOYFE de Madrid y por las mañanas trabajaba en la empresa Materiales y Reactivos. A pesar de ello, tenía tiempo, al pensarlo hoy en día no sé como lo conseguía, para visitar en la Cátedra a Antonio Luis, y charlar con él de su tesis doctoral, observar las técnicas que utilizaba y en ocasiones, escuchar a D. Antonio, mientras resolvían algún problema que hubiera surgido en la investigación que estaban realizando. En esos días, oiría palabras que luego me han acompañado a lo largo de toda mi vida profesional, xantatos, ditiocarbamatos, oxinatos, etc, y que en aquella época me parecían casi indescifrables, pues si bien en la Licenciatura las había estudiado como de pasada, no podía imaginar que posteriormente fueran tan importantes en mi vida.

A lo largo de estas visitas, durante finales de 1975 y comienzos del 76, me fueron animando para que, dado que existía la posibilidad de ocupar una plaza de Profesor Ayudante de Clases Prácticas que estaba vacante, me trasladara desde la Facultad de Ciencias a la Facultad de Farmacia.

Finalmente me animé y el 1 de octubre de 1976 comienza mi andadura como Prof. en la Cátedra de Química Inorgánica y Analítica, bajo la dirección de D. Antonio. Nunca olvidaré como me acogieron todos los que formaban la Cátedra en aquellos días, los Profesores D. Fermín Ruiz, D. José Martínez, D. Manuel G^a Mirasierra y D. Antonio Luis Doadrio, las Profesoras Dña. Consuelo Molina, Dña. Esther Parrondo, Dña. M^a Teresa Gutiérrez, Dña. M^a Pilar Álvarez, Dña. Rocío Touchard y Dña. M^a Isabel de Frutos, M^a Jesús Dueñas (secretaria administrativa) y Mariano y Manola (personal laboral). Eran una “gran familia” y cariñosamente me integraron en ella.

La plaza de Profesor ayudante de Clases Prácticas conllevaba el impartir prácticas tanto por la mañana como por la tarde, además de, por supuesto, tener que realizar la Tesis Doctoral, por lo que tuve que dejar el Laboratorio de Materiales y Reactivos con el consiguiente perjuicio económico acuciante en mi caso, pues estaba casado y con una hija.

Estos problemas económicos, duraron escasamente dos meses, pues en el mes de noviembre, D. Antonio me llamó a su despacho para ofrecerme el puesto de Prof. Encargado de las asignaturas de Química Inorgánica y Química Analítica de la Licenciatura de CC. Químicas en el C.U.T. adscrito a la UCM, pues según la normativa de los colegios universitarios, las asignaturas dependían de cátedras o departamentos de esta Universidad, y por tanto, no existía incompatibilidad alguna. A pesar de las obligaciones y responsabilidades que tenía el aceptar este reto, D. Antonio me animó y me indicó que siempre estaría dispuesto a ayudarme, como así hizo cada vez que tenía alguna duda. Acepté y desde 1976 hasta 1989, estuve impartiendo docencia en Toledo. De esta manera tan sutil D. Antonio no sólo me solucionó los problemas económicos sino que también consiguió que me formara en la docencia.

Durante cinco años, realicé mi tesis doctoral sobre “Complejos de Mo (V) con oxinas y sus derivados”, bajo su dirección y la del Prof. Antonio Luis Doadrio Villarejo. En estos años pude apreciar su minuciosidad, su gran saber y sobre todo su gran “perspicacia química e intuición”, como queda demostrado por sus numerosos trabajos, anteriores a 1970, en los que la falta de medios y de técnicas instrumentales, quedan suplidos por esta gran intuición y saber químico.

Mientras que nosotros teníamos que esperar a hacer los análisis, o realizar las diferentes medidas, para saber si el complejo obtenido era el deseado o no, D. Antonio sólo con verlo, nos decía si era de Mo (VI), para nuestra frustración, o Mo(V), para nuestra alegría.

A pesar de esta intuición y seguridad, no se contentaba con los resultados obtenidos y deseaba siempre que los completáramos con la síntesis de otros compuestos semejantes o bien con otros análisis o ensayos complementarios.

A lo largo de estos años, no sólo se preocupaba de nuestra formación, tanto docente como investigadora, sino que también conseguía

la financiación adecuada para dotar a la Cátedra de la instrumentación necesaria de tal modo que en esos años éramos uno de los laboratorios que disponía de mejores técnicas y aparataje.

Recuerdo que cuando el Prof. Doadrio Villarejo y yo ya creíamos que la tesis había finalizado, D. Antonio nos indicó que para confirmar algunos datos sintetizáramos algunos complejos más, pues habíamos aislado un tipo de complejos que se desconocía hasta ese momento. Afortunadamente para mí, pues suponía un año más de trabajo, el laboratorio había dejado de fabricar el ligando que necesitábamos por lo que se lo indicamos y dio por finalizada la tesis. (Años posteriores, otros autores han sintetizado por otros medios estos complejos y han confirmado nuestras estructuras).

No sé quien tenía más nervios cuando llegó el momento de la lectura, si D. Antonio o yo, pues tenía que leerla en la Facultad de Ciencias Químicas. Recuerdo como me decía “Lozano, (pues curiosamente a los hombres de la Cátedra, excepto al Prof. D. Fermín Ruiz (y evidentemente a sus hijos) nos llamaba por el apellido mientras que a las mujeres las llamaba por su nombre), no debe Vd. estar nervioso pues siempre la persona que más sabe de la tesis es el que la hace”, cuando en realidad creo que él estaba tan nervioso como yo.

Durante estos 5 años de realización de la tesis doctoral, D. Antonio me inculcó una característica suya y era la importancia que tienen los alumnos en nuestra labor universitaria.

Para D. Antonio, la investigación no cabe duda, era importante, como queda reflejado en su extenso currículum, con más de 200 trabajos publicados en revistas nacionales e internacionales, de los que al menos 50 fueron publicados en unos años en los que los medios de los que se disponían eran escasos y esta escasez era necesario suplirla con el buen saber químico. Sin embargo, los alumnos y la docencia eran fundamentales en su vida.

Si alguno de los miembros del Departamento, estábamos comentando con él algún aspecto de la investigación que estuviéramos realizando, y llegaba un alumno para consultar cualquier duda, ya sabíamos que teníamos que dejar la conversación para otro momento, pues según nos decía “los alumnos eran lo más importante en nuestra profesión pues son nuestra razón de ser”. Frecuentemente, si teníamos al-

guna pequeña duda, aprovechábamos cuando salía de la clase de tarde, mientras que recogía sus apuntes e iba al aparcamiento, pues sabíamos que teníamos tres plantas andando para hablar con él hasta llegar al coche.

Si cualquiera de nosotros nos encontramos con algún farmacéutico/a que haya estudiado en la UCM y hablamos de los profesores que tuvo durante sus estudios, unánimemente todos nos dirán que D. Antonio fue uno de los mejores docentes que tuvo en la carrera.

Pueden por tanto Vds. imaginar todo lo que pasó por mi cabeza, cuando un martes sobre las 10 de la noche recibo una llamada telefónica de D. Antonio y me comunica que al día siguiente le habían convocado a una Junta de Gobierno Extraordinaria y que por tanto no podría dar la clase de las 9 de Química General y que si yo le podría sustituir. Por supuesto que acepté a su solicitud y no mandato pues D. Antonio nunca nos obligaba, y a pesar de mi experiencia de 7 años dando clase y de estar toda la noche preparando la lección (aunque la había impartido el día anterior en el grupo del cual yo era Profesor responsable), creo que el tener que sustituir a D. Antonio en una clase y “no quedar mal” me provocó un enorme pánico al entrar en clase que afortunadamente no he vuelto a padecer, ni siquiera en la encerrona de la oposición. Nunca logré enterarme si era una sustitución necesaria o un método para probarme, pero el hecho fue que a partir de ese día le sustituí en ocasiones que sí eran reales.

Hasta su jubilación, anticipada a los 65 años por cambio de la legislación, impartía tres diferentes asignaturas, Química General, Química Inorgánica y Química Bioinorgánica. A pesar de su experiencia, sus múltiples conocimientos y su prodigiosa memoria, siempre le veíamos encerrado en su despacho, preparándose la clase que debía impartir y confeccionándose la pequeña chuleta en la que se apuntaba el guión de la materia que explicaría ese día. Todos sabíamos que durante ese tiempo, no deberíamos molestarlo.

Afortunadamente, a pesar de esta jubilación anticipada, pudimos contar con él siete años más, pues fue nombrado Profesor Emérito y siguió impartiendo la asignatura que él creó: “Química Bioinorgánica”.

A finales de los 70 y comienzos de los 80, comenzó a impartir Química Bioinorgánica. Esta disciplina que era totalmente descono-

cida en España, hoy en día se imparte en todas las Facultades de Farmacia de España y en muchas Facultades de Ciencias. Elaboró el primer programa de esta asignatura, así como, los primeros apuntes editados. Apuntes que hasta el final de su nombramiento como Emérito siguió ampliando y perfeccionando.

La gran capacidad docente de D. Antonio, queda reflejada en las opiniones de los alumnos, los jueces más severos y estrictos que existen para un docente. Para ellos, las asignaturas que explicaba eran unas “Marías” ya que casi no tenían que estudiarlas, pues bastaba con asistir a clase, atender sus explicaciones y tomar los apuntes para poder aprobarlas.

Yo no he podido asistir a las clases de D. Antonio. No me dejaba, pues decía que le miraba tan fijamente (soy miope), que le ponía nervioso, pero sí he asistido a diversas conferencias suyas y efectivamente debo estar de acuerdo con las opiniones de los alumnos. A pesar de la complejidad que tuviera el tema del que estuviera disertando, a todo el público nos parecía que era algo facilísimo de comprender.

Era una de las características de D. Antonio docente “Hacer comprensible y asequible todo aquello que explicaba, independiente de la dificultad del tema”.

Aunque ya hace muchos años que abandonó la Facultad, todavía recordamos y añoramos, los miembros antiguos de la Cátedra (hoy departamento), el café de las mañanas en el despacho situado enfrente a la Secretaría del mismo. Allí, mientras tomábamos café, charlábamos sobre la Facultad, las asignaturas que impartíamos, la economía, la política y como no de la gastronomía. A D. Antonio, a pesar de haber sido operado de estómago, seguía gustándole el buen comer y cada vez que nos contaba lo que había comido o cenado el día anterior yo, que también había sido operado de estómago antes que él, me preguntaba como lo podía aguantar.

Desde que ingresó como alumno en la Facultad en 1939, al finalizar la guerra, no la abandonó, excepto mientras que realizó su servicio militar, reincorporándose en 1946. Tras 49 años ininterrumpidos como profesor en la Facultad de Farmacia, D. Antonio nos dejó discretamente al finalizar su emeritaje, impartiendo su última clase el 20 de mayo de 1994, a la que afortunadamente sí pude asistir y fui tes-

tigo de la ovación que recibió por parte de sus alumnos y todos los asistentes al acto.

Estos años dedicados a la Universidad se ven reflejados en la publicación de numerosos trabajos de investigación, múltiples comunicaciones a congresos, dirección de tesis doctorales, numerosísimas conferencias, diversos cargos académicos como Decano de la Facultad de Farmacia, Secretario General de la Universidad, Académico de Número de esta RANF, pero sobre todo, en un número elevadísimo de alumnos y discípulos, entre los que me encuentro, y que nunca le olvidaremos.

Muchas gracias D. Antonio.

El decanato de Antonio Doadrio López

Prof. Dr. Benito del Castillo García

Académico Numerario de la RANF. Decano Honorario de la Facultad de Farmacia de la UCM y Presidente Honorario de la Conferencia Nacional de Decanos de Facultades de Farmacia de España.

Excma. Sra. Presidenta de la RANF.

Excmas. y Excmos. Sras. y Sres. Académicos.

Querida familia de D. Antonio Doadrio.

Compañeros y amigos.

Señoras y Señores.

En primer lugar debo expresar mi satisfacción y agradecimiento por la alta distinción que la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) me concede, por el honor que para mí representa haber sido propuesto por su Junta de Gobierno, para participar en este importante Acto Académico en que se rinde justo homenaje a la figura señera del Profesor Doadrio.

Acepten mi saludo y felicitación los Sres. Académicos, que me han precedido en el uso de la palabra pidiendo disculpas a todos Vds. por la posible reiteración de alguna idea que expondré a continuación.

Don Antonio Doadrio López, era doctor en Farmacia y Ciencias Químicas, miembro numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España y ostentaba numerosas distinciones y gozó de múltiples reconocimientos; pero para mí, varios hechos de su larga vida, le han situado junto a la mía y son los que desearía ahora destacar.

Recién incorporado yo como alumno a la Facultad de Farmacia, en la prodigiosa década de los 60, donde el “op art”, el “Che”, el mayo francés, la llegada del hombre a la Luna y la guerra del Vietnam eran actualidad, don Antonio durante dos años consecutivos, también fue actualidad, pues era mi profesor de Química Inorgánica Analítica en

2º curso y Química Inorgánica Aplicada en 3º. Coincidieron esas enseñanzas con sus oposiciones a cátedra, que por cierto ganó brillantemente. Asistí personalmente a alguno de sus ejercicios y también al acto público de la votación final de los miembros del tribunal que le juzgó. Como homenaje, por suscripción popular, le regalamos, la toga, birrete y muceta que tantas veces usaría en actos académicos, ofreciéndole asimismo, un banquete en el Círculo de Bellas Artes.

Fue un docente magnífico e innovador en todos los aspectos teóricos y prácticos. Junto a la famosa “marcha analítica”, en el laboratorio, flotaban en el ambiente del aula los nuevos orbitales y las hibridaciones. Fue un profesor muy popular entre sus alumnos españoles y extranjeros.

Desde 1975 hasta 1987, fue decano de nuestra Facultad. Al cabo de cuatro meses, tras su jubilación, en 1988, se convocaron elecciones para cubrir su vacante del decanato. Animado por bastantes compañeros y alumnos, decidí presentar mi candidatura. Así pues, desde hace más de 20 años, tuve la responsabilidad de sucederle, representando y dirigiendo la clásica y a la vez vital e innovadora Facultad de Farmacia de Madrid, de donde han salido poetas (León Felipe) y escritores (Raúl Guerra), directores de la Unesco (Federico Mayor Zaragoza), Rectores de la UCM (Rioz, Carracido o Giral) y por lo menos tres presidentes del CSIC (uno de ellos nuestro compañero, César Nombela), además de científicos de la talla de Moles, Albareda, Medinaveitia o Santos. En la actualidad, un discípulo de D. Antonio, el Prof. Lozano, ostenta el cargo de Decano, estando seguro de que alcanzará el éxito en su gestión, dirigiendo con acierto a nuestra querida Facultad de Farmacia.

En este privilegiado caldo de cultivo le cupo a don Antonio Doadrio ser decano. Fue testigo directo de grandes cambios en la Universidad española. Los asumió, los integró y los desarrolló. A pesar de su delicada salud, en ocasiones, continuó en la brecha como profesor emérito, impartiendo la docencia de la Química Bioinorgánica. La Junta de Facultad, en señal de reconocimiento a su vida y obra y a propuesta mía, le nombró Decano Honorario.

Hoy, la RANF ha decidido honrar públicamente a don Antonio a través del actual Decano, discípulo suyo, y de dos burgaleses (uno de adopción y otro de nación), para glosar su vida y obra.

Somos, a pesar de nuestro origen complutense, singulares en lo nuestro. Así pues, también a nivel individual rendiremos homenaje singular a D. Antonio, porque singular y excepcional fue su peripécia vital.

Para preparar mi intervención de hoy, decidí adentrarme en los libros de Actas de nuestra Junta de Facultad, en el dilatado período comprendido entre el 29 de noviembre de 1975 (en que sustituye a don Ángel Hoyos de Castro) y el 25 de septiembre de 1987.

Don Antonio, tuvo una actividad desbordante en sus casi doce años de decanato, sirva como botón de muestra, indicar que bajo su mandato se celebraron 72 Juntas de Facultad; alguna en sesión de 2 días. Se trataron los temas habituales: informe de Junta de Gobierno, Tribunales de Tesis, Institutos Universitarios, plantillas de profesorado, planes de estudio, tutorías, número de alumnos a admitir, comisiones delegadas de Junta de Facultad, elecciones de alumnos, coordinación de programas de las distintas asignaturas, ampliación de clases teóricas a través de seminarios, premios extraordinarios de licenciatura y doctorado y un largo etc.

Asimismo, fueron numerosas las sesiones extraordinarias o de la Comisión Permanente, amén de otras Comisiones, tanto de la Facultad como del Rectorado en las que Don Antonio, ostentó la representación de la Facultad de Farmacia, además de pertenecer a la Junta de Gobierno de la UCM.

De la lectura de las Actas de la Junta de Facultad que presidió el Dr. Doadrio, se puede constatar la evolución, desde las primeras, a finales de la década de los 70, en que prácticamente solo asistían catedráticos y presencia testimonial de alumnos hasta el incremento sucesivo de profesores numerarios y no numerarios, primero adjuntos y luego agregados; asimismo los estudiantes incrementan su presencia desde 1 hasta bastantes más por curso. Igualmente ocurrió con sus colaboradores más directos del equipo de Gobierno de la Facultad de Farmacia, en que de 1 vicedecano pasó a 2, y posteriormente a 4. Debo comentar también que, desde sus comienzos, había Secretario y Vicesecretario.

Su equipo se fue aumentando paulatinamente, los más directos miembros del equipo decanal fueron los profesores: D. Manuel Gómez

Serranillos, D. Gregorio González Trigo, D. Manuel Ortega Mata, D. León Villanúa Fungairino y en sus últimos años de decanato D. Juan B. Abad Manrique, D. Manuel Ruiz Amil, D^a Rocío Muñoz Calvo, D. José L. Guillén Llera, D. Juan Hernando, D. Francisco Zaragoza y Doña M^a Isabel de Frutos Martínez. Como se puede deducir, un amplio y selecto abanico de profesores, de prácticamente todas las áreas de conocimiento y estilos.

Entre el personal no docente figuraron, D^a Dolores Reneses, D. Joaquín Vara, D^a M^a Paz Ávila, D. José María Negredo, D. Juan Bragado, D^a Pilar Pina, Luciano y otros que, con el pasar de los años, ocuparon puestos de responsabilidad administrativa, tales como D^a Celia Bargueño, D. Francisco Ruiz, D^a María Quijano, ...

En la primera época del decano Doadrio, los profesores asistentes a las Juntas, rondaban la treintena, la duración de las mismas aproximadamente 2 horas y media (tanto en sesión matutina como vespertina). El número de puntos sometidos a estudio y aprobación, oscila entre 1 y 11, según circunstancias. Los acuerdos, fueron alcanzados mayoritariamente y en pocos casos, tras votación.

En cualquier caso, a D. Antonio le gustaba organizar y dirigir personalmente todos los asuntos, desde los temas de doctorado a los económicos, llegando a veces a asombrar por su desbordante actividad peripatética, desde el decanato a su cátedra. A pesar de ello, siempre había espacio y dedicación en su tiempo para todos y en especial para los alumnos.

Yo le calificaría como el último decano del Plan Antiguo a quien le correspondió hacer la transición. A este respecto, recuerdo cuando D. Ángel Santos, como Director de la RAF y yo bisoño Decano de la Facultad de Farmacia, me sugirió tras el cambio de sede del Instituto Nacional de Toxicología, el traslado del Museo de la Farmacia Hispana a la calle de la Farmacia.

Puesto que había transcurrido casi un mes y aún no había dado respuesta a su propuesta, ante mi contestación, indicándole que debía negociar, y que esta labor lleva muchas horas de diplomacia, me espetó: “no me cuente nada, yo sé lo que es ser decano”.

La situación de D. Ángel no fue la de D. Antonio, ni la de ellos se pareció a la mía.

Según me contó el propio Prof. Doadrio, durante sus últimos años de decanato en el período rectoral del Profesor Bustelo, solía organizar con otros decanos, cenas previas a las Juntas de Gobierno, para debatir y encauzar asuntos que luego se tratarían; no en vano, él era el decano más antiguo y además tenía experiencia acumulada, por haber ocupado otros cargos de responsabilidad en el rectorado y ministerio. Según me consta, siempre se mantuvo en posiciones moderadas.

El actual Rector Carlos Berzosa, coincidió con el Profesor Doadrio y conmigo, como decano de la Facultad de Ciencias Económicas. Tuvo buena opinión de D. Antonio, así me lo manifestó en varias ocasiones, y lo hizo público en el acto de inauguración de la ampliación de la Facultad de Farmacia de la UCM, el 3 de octubre de 2005.

En los años difíciles de la transición, según se deduce de las intervenciones en Junta de Facultad, hubo propuestas modernizadoras de los profesores Juana González Parra, Ana Crespo, Ángel Giménez Solves y Moreno. Del conjunto de los miembros de Junta de Facultad, me gustaría destacar las atinadas de los profesores Hoyos, Folch, González Trigo, Gómez Serranillos, Ortega y Ladero, en los primeros años. De las actividades de los estudiantes, indicar que siempre fueron constructivas, adecuadas y casi me atrevería a concluir, que demasiado sesudas, por diplomáticas, para su edad e inexperiencia.

También comienza a evolucionar; bajo su mandato decanal, el concepto universitario de Cátedra a Departamento y de Jefe de Departamento a Director de Departamento.

De la lectura y estudio de las Actas de Junta de Facultad, celebradas bajo la presidencia de D. Antonio, he podido observar, notables diferencias, tanto en el fondo de las cuestiones tratadas, como en su forma de redacción. El primer aspecto, suele aparecer bien expuesto, así como, las opiniones de los distintos intervinientes, con los acuerdos alcanzados claramente descritos. En cuanto a la forma de redacción, es muy variada, pasando de la concisión a la descripción pormenorizada y del estilo serio y riguroso a la expresión familiar y coloquial. En definitiva, distintos estilos de los diferentes secretarios académicos, que actuaron como fedatarios bajo su decanato.

Muchos de estos hechos, por haberlos también vivido yo personalmente, tienen la frescura de la cotidianeidad en la historia contempo-

ránea de nuestra Facultad de Farmacia, en el periodo en que fue dirigida por el Prof. Doadrio.

A lo largo de su mandato, tuvo que afrontar huelgas de profesores y estudiantes, promovidas tanto a nivel general del país, como de la UCM, con reivindicaciones de todo tipo, muchas veces capeando el temporal, ante posiciones de desencuentro, tal como acaeció a finales de 1979. Con frecuencia, debe tratar de resolver problemas que exceden a sus competencias, como la petición de juntas paritarias.

Bajo su decanato surge la nueva Facultad de Farmacia en Alcalá y se va haciendo hueco, cada vez más firmemente, el CEU San Pablo. Sin embargo, aumenta sin cesar el número de alumnos que demanda estudiar Farmacia en la UCM, más de los deseados en nuestra Facultad, por falta de medios materiales y humanos.

En los últimos años de la década de los 70, comienza a eclosionar un nuevo Plan de Estudios, con las desazones y roces que siempre surgen en la propia facultad y la incomprensión y, a veces, inflexibilidad del Rectorado y Ministerio. En estas aguas difíciles, Doadrio navega con buen rumbo, con más alumnos, pero también con nuevos profesores en las aulas del edificio que hoy lleva su nombre. En estos años se incorporan los profesores Gastón, Rivas Martínez, Vilas Sánchez, Varela, Barceló y Piédrola, entre otros.

Todo este panorama, está además sazonado con diversos problemas surgidos en el Departamento de Físicoquímica, ante la actitud beligerante de los estudiantes. Supongo que en esos días, D. Antonio tuvo horas difíciles, que a buen seguro, superó con clarividencia.

La Facultad de Farmacia madrileña y su decano también, ven ausentarse con pena a uno de sus más prestigiosos profesores, D. Manuel Ortega, que se hará cargo de la nueva facultad hermana alcalaína.

También le cupo la satisfacción a D. Antonio, de informar a su Junta de Facultad, que el Decano Honorario D. Ángel Santos Ruiz, había sido elegido Director de la RAF.

La mejora de la calidad de la enseñanza, tanto teórica como práctica, es una obsesión del decano Doadrio, tratando de lograrlo por todos los medios a su disposición.

Por esas fechas el Ministerio de Educación, además de imponer Planes de Estudios, comienza a abordar una sustancial reforma universitaria, que cíclicamente prosigue y creo que nunca concluirá.

En la Junta de Facultad del 20 de octubre de 1978, al estar pendiente de promulgación de la Ley de Autonomía Universitaria, se propone prorrogar el mandato del Decano y posponer las elecciones que por esas fechas correspondía celebrar, hasta que surja el nuevo marco legal. Sin embargo, se produce por parte del Rectorado, la denegación a dicho acuerdo.

A fin de resolver la situación, el 7 de noviembre de 1978, don Antonio, convoca y preside su decimoséptima Junta de Facultad, con carácter extraordinario, para estudiar el tema, ya que la nueva Ley de Autonomía Universitaria, incluirá disposiciones complementarias que regulará la elección de decanos.

El rectorado indica, que a fin de cumplir los Estatutos, entonces vigentes y evitar interinidades, el vicedecano más antiguo, convocará el Claustro de Facultad. Parecía lógica la postura de la Junta de Facultad, demorando las elecciones, ya que con la nueva ley variaba el grupo de electores y elegibles, y además había precedentes en la UCM. En consecuencia, se acuerda iniciar el proceso electoral.

La lógica viene a dar la razón a la Junta de Facultad, y tras celebrarse las elecciones en 1979, Don Antonio Doadrio es elegido decano nuevamente.

En mayo de ese año, mi promoción, la última de seis años, celebró el 10º aniversario de la finalización de nuestros estudios. Don Antonio, nos recibió y almorzó con nosotros en la cafetería de la Facultad, recién repuesto de una operación, que no le impidió acompañarnos, pues nos profesaba un especial afecto.

Por esas fechas, también comienza el proceso electoral de Rector de la UCM, con posturas encontradas. A nivel interno, mencionar que causan baja, bien por traslado o acceso, los profesores D. José González Castro, D. Miguel Ladero, D. Ángel Navarro y D. Luis San Román y se incorporan, D. Antonio Martínez y D. César Nombela. Así mismo, se da cuenta de la concesión de la Gran Cruz de Alfonso X "El Sabio" a D. Pablo Sanz Pedrero.

También y ante el acoso externo, se debate la oportunidad de adjetivar a las disciplinas de nuestro Plan de Estudios, con el término “aplicada” o “farmacéutica”.

A finales de 1979, se incorpora al equipo decanal, la primera mujer, la profesora Rocío Muñoz Calvo, como Secretaria Académica, cargo que ostentará durante más de ocho años, amén de haber sido elegida Madrina de la muy osada Tuna de Alquimistas de la Facultad de Farmacia.

La parte triste de esta época, la constituye el fallecimiento del profesor Montequi, ilustre Catedrático y Académico, predecesor de D. Antonio en la docencia de la Química Inorgánica. También asistió apesadumbrado a las jubilaciones de profesores emblemáticos de la Facultad, tales como Rivas Goday, Casares o Folch o a los fallecimientos de otros, como D. Obdulio Fernández y D. José Lucas Gallego, que también fueron decanos. Sin embargo, presencié incorporaciones relevantes.

Tuvo que actuar en primera persona, para lograr una rápida y conveniente promulgación del Decreto de Especializaciones Farmacéuticas, hospitalarias y no hospitalarias, que al fin vio la luz, siendo Ministro de Educación, nuestro compañero Federico Mayor.

En su quehacer más interno, hubo de consumir largas conversaciones y debates sobre la ordenación de los exámenes finales, supresión de clases para la realización de parciales, permanencia y admisión de alumnos, becas, adecuación de los numerosos cursos de doctorado, contrataciones, bajos presupuestos, colaboradores honoríficos, y otros problemas, tan simples o complejos, como los derivados de la utilización de la biblioteca, gimnasio, cafetería o aparcamiento de coches, por los diferentes usuarios.

El comienzo de la década de los 80, no fue sencillo, pues el 23 de febrero de 1981 y según consta en las Actas, ante la violenta ocupación del Congreso de los Diputados, se celebra una Junta Extraordinaria de Facultad, emitiéndose un rotundo comunicado de apoyo al Parlamento y a la Constitución Española. En similares términos, previamente fueron redactados escritos, por el Decano Doadrio y el Rector Bustelo, que firme y decididamente optaban por la libertad, democracia y convivencia pacífica, como lema de todos los universitarios, de cualquier estamento y nivel.

Las convocatorias ministeriales para las pruebas del FIR, siguen siendo lesivas para los farmacéuticos, por lo que los afectados se ven ayudados por la Facultad de Farmacia y el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Obviamente, la Junta de Facultad, presidida por su decano, apoya a sus antiguos alumnos, así como propicia, la incorporación de nuevas especializaciones al catálogo, especialmente las no hospitalarias.

También los profesores adjuntos y los estudiantes, reiteran sus reivindicaciones por distintos motivos. Las intervenciones del Profesor Guillermo Folch en estos asuntos, son relevantes y constructivas. Son tiempos convulsos en la Universidad. Las distintas comisiones, cobran cada vez más protagonismo. La habilidad del decano Doadrio, caracteriza este periodo.

En 1981 la Junta de Facultad se congratula por el nombramiento del Prof. Rivas Martínez, como Vicerrector de Investigación de la UCM y del Prof. Vian Ortuño, como Rector Honorario. El Rector Bustelo, inicia un delicado y difícil proceso de formación del Claustro Universitario.

El Sr. Decano prepara la conmemoración del centenario del nacimiento de D. Rafael Folch que fue Catedrático y Secretario de la Facultad de Farmacia.

En ese año, se da cuenta del fallecimiento de D. Salvador Rivas Goday, ilustre y querido profesor de Botánica.

En esos tiempos, se suscita la duración de las vacaciones en la Universidad, con disparidad de criterios.

La solapada lucha en las altas esferas, por la denominación de las distintas cátedras continúa, a través del perverso sistema de “analogías” y “equiparaciones”, casi siempre perjudiciales para las Facultades de Farmacia. Doadrio y su Facultad, no tienen descanso.

También corren tiempos en que los sueldos de los profesores se tratan de cubrir con la “bufanda” del Complemento de Investigación. Los presupuestos universitarios siguen siendo ridículos en esta España nuestra.

Se notifica en esas fechas, el traslado de los profesores Higuera, Sánchez Moscoso y Álvarez Builla, a otras universidades.

El 25 de marzo de 1982, nuevamente es elegido Decano de la Facultad de Farmacia el Profesor Doadrio. En la votación intervienen profesores numerarios, no numerarios, alumnos y personal no docente, con distinto porcentaje de representación. Todos los estamentos dieron su apoyo a Don Antonio. Previamente se produjo el correspondiente debate sobre los diversos temas relacionados con la elección.

Por esos tiempos, la Universidad Complutense, impone el impopular control de firmas al profesorado.

La vida universitaria va transcurriendo vertiginosamente: en 1983 el Decano Honorario, Don Ángel Santos Ruiz, es nombrado Profesor Emérito, en ese mismo año, otro ex-decano, Don Ángel Hoyos de Castro se jubila, concediéndosele la Medalla de Oro de la Facultad

En mayo de 1982, se acuerda por unanimidad, rendir un merecido homenaje y conceder la Medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de Don Ángel Santos Ruiz, asimismo y a propuesta de D. Gregorio Varela, se propicia el nombramiento del Prof. Arnold E. Bender, como Doctor Honoris Causa.

También ese año, 1982, el Prof. Vicente Vilas, causa baja en nuestra Facultad de Farmacia por acceder a la cátedra de Físicoquímica de Valencia y posteriormente a Alcalá.

Asimismo, he de constatar el importante número de Tesis Doctorales que se leen en esa época.

La composición y porcentajes para formar parte de las comisiones de plazas de profesorado, es un asunto de amplio debate, en función del paralelismo, propuesto en el “miniclaustro” de la UCM.

También se da cuenta de la concesión de la prestigiosa medalla de Schellers al Prof. Guillermo Folch.

El decano Doadrio, debe enfrentarse a los estudiantes de la ETS de Ingenieros de Telecomunicaciones, que en las fechas previas a nuestra patrona, la Inmaculada Concepción, acuden de forma poco ortodoxa a visitar la Facultad de Farmacia, para celebrar San Teleco.

Otra señora, la Prof^{ta}. D^a Isabel de Frutos, es nombrada Vicesecretaria de la Facultad de Farmacia.

También en 1982, se gestiona la adquisición de una farmacia madrileña del siglo XIX, que pasará e engrosar los fondos del Museo de la Farmacia Hispana.

Comienza el año 1983, con el amplio debate sobre los nuevos Estatutos de la UCM y el Decreto de Especializaciones Farmacéuticas. La Facultad de Farmacia, toma postura ante esta nueva perspectiva y el decano Doadrio, jugará un papel relevante.

Los Estatutos de la UCM, habrán de atenerse al Proyecto de la nueva Ley de Reforma Universitaria (LRU), lo cual hace que la reflexión y debate sean intensos, ya que hay intereses contrapuestos. El Claustro constituyente de nuestra UCM, deberá abordar una misión histórica, sazonado por la Comisión Consultiva y por la Junta de Gobierno. Son cinco caballos de pura sangre, compitiendo por el objetivo de mejorar y modernizar nuestra institución universitaria. Como telón de fondo, también está la elección de Rector.

En estos debates, los profesores Nombela y Martínez, intervienen muy activamente. La página triste la constituye, el fallecimiento del Profesor Eliseo Gastón de Iriarte. Con motivo de su jubilación como Catedrático, se propone la concesión de la Medalla de Oro de la Facultad a D. Ángel Hoyos de Castro.

El Profesor Folch, recibe otro galardón en ese año, la Medalla Urdang que concede la Sociedad Americana de Historia de la Farmacia, con sede en Washington.

En ese año, se perfilan las incompatibilidades del profesorado, las tutorías a los alumnos, las pruebas de idoneidad, el acceso de Adjuntos a Titulares y de Agregados a Catedráticos, las áreas de conocimiento y la creación del Instituto de Bioquímica, con sede en la Facultad de Farmacia, al amparo del Convenio Marco UCM-CSIC.

El Profesor Domínguez Carmona, se integra en la Junta de Facultad, y el Profesor Sanz Pedrero, sustituye en la dirección del Departamento de Físicoquímica al Profesor Otero Aenlle, que cesa por jubilación.

El año 1984, comienza con la agradable noticia de importantes nombramientos a los profesores Martínez y Crespo. En el otro platillo de la balanza, está el desarrollo de las “Áreas de Conocimiento”,

espada de Damocles que pendía sobre muchas asignaturas de la licenciatura de Farmacia, así como, sobre la constitución de los departamentos y sus plantillas de profesorado, pero sin tener en cuenta el número de alumnos y recursos disponibles.

El decano Doadrio, debate muy diligentemente estos asuntos con los miembros de Junta de Facultad, abogando por la creación de áreas farmacéuticas, para salvaguardar nuestra identidad, en el mismo sentido que otros decanos de Farmacia españoles.

El nuevo marco legal, también afecta negativamente a la dotación de plazas vacantes de profesorado, con lo que se abre otro frente en el Rectorado, donde debe lidiar el Dr. Doadrio. Será apoyado en su labor por el Profesor Ruiz Amil, nuevo vicedecano de Ordenación Académica.

Bajo la dirección del Profesor Doadrio, el año 1985, se presenta aparentemente más sosegado y optimista, pues puede anunciar que hay nuevas plazas de profesorado disponibles, que la implantación del nuevo Plan de Estudios no es inmediata y que la centralización bibliotecaria y el apoyo informático ya están en marcha.

A propuesta del Prof. Folch y como consecuencia de la desaparición del Departamento de Historia y Legislación Farmacéutica y apoyado por el decano Doadrio, se considera oportuno y necesario crear el Patronato del Museo de la Farmacia Hispana, para salvaguardar sus fines y fondos. Persiguen buscar cauces legales y ayuda económica, para su mejor funcionamiento, así como establecer convenios con distintas instituciones farmacéuticas y con la CAM.

Asímismo, se propone nombrar a D. Guillermo Folch, director perpetuo del Museo de la Farmacia Hispana y convocar su cátedra a oposición, con la denominación de "Historia y Legislación Farmacéutica".

El Dr. Doadrio, tuvo que afrontar en estas fechas, el espinoso asunto de la propuesta de profesores eméritos de la Facultad de Farmacia, pues no había plazas para todos los candidatos.

También hubo que luchar y argumentar, cuando en el equipo rectoral que gobernaba la UCM, surgió la idea de modificar unilateralmente y maliciosamente, la composición de los tribunales de tesis doctorales.

El año 1986, se inicia con la constitución de una nueva Junta de Facultad y del correspondiente Comité Electoral del centro, previstos para la próxima elección de decano. El electo nuevamente será don Antonio Doadrio.

Dos profesoras de nuestra Facultad de Farmacia, nos abandonan prematuramente, Carmen Saiz Vadillo y Cristina Valls. La página amable se escribe con la noticia de la promoción académica de las profesoras Torija, Barreno y Gutiérrez Ríos, así como el nombramiento de los nuevos vicedecanos, profesores Zaragoza y Hernando, que acompañarán a los profesores Guillén y Ruiz Amil.

La nueva reglamentación para constituir departamentos en la Facultad de Farmacia, también se encara con optimismo, aunque dos de los preexistentes (Fisiología Vegetal e Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica), deberán asociarse a Botánica y Tecnología Farmacéutica. Fisiología Animal, se constituye como Sección Departamental, otros son singulares o bien reciben el apoyo del CSIC, para constituirse.

Tras solucionar estos asuntos, posteriormente debe solventar la adscripción de profesores a los distintos departamentos existentes. La casuística es muy variada, pero al final se logran soluciones adecuadas, evitándose litigios contraproducentes. A continuación vendrá un continuo goteo de cambios de área de conocimiento. Los estudiantes y PAS, en este período, comienzan a participar en las diferentes comisiones, que cada vez son más activas.

El nuevo Plan de Estudios, comienza a balbucear, pero en un escenario decantado en el grupo de las Ciencias Experimentales, y no en el de Ciencias de la Salud. El decano Doadrio, tratará de compaginar ambas situaciones. Los estudiantes hicieron una pegatina en que se leía: "Farmacia es Sanidad y no Ciencias del Mar".

La Comisión de Farmacia, estuvo presidida por el Prof. Emilio Herrera, y contó con la participación de dos profesores complutenses, los doctores Zaragoza y Cadórniga. Se pretendió reforzar el concepto de ciclo en este nuevo Plan.

Nuevos profesores numerarios se incorporan o promocionan en la Facultad de Farmacia: Villar, Cortijo, Baztán, Carretero, Sánchez Covisa, Benedí, Martín Gómez, Frutos, Escrivá, Lorenzo, Rotger, Díez

Marqués y Ortega Anta, así como una nueva bibliotecaria. Los profesores Varela y González Trigo, serán eméritos.

El decano Doadrio, anuncia la concesión de un crédito flexible a las distintas Facultades, para distribuir según las necesidades docentes, entre Catedráticos, Titulares y Ayudantes, tema que suscita gran expectación. También los Asociados tendrán presencia.

Asimismo, propone una solución original y salomónica para armonizar la enseñanza de una clásica disciplina, crear la unidad docente de didáctica de Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica, donde se ubicarían profesores adscritos a Farmacia y Medicina.

Bastantes nuevos profesores se incorporan en esta época y también nuevos miembros integrarán la Junta de Facultad, distribuyéndose en las comisiones existentes. Obviamente, pertenecer a la Comisión de Plan de Estudios, es la opción más deseada.

Su último año de decanato, 1987, comienza con una Junta de Facultad extraordinaria y un crudo debate, promovido por los profesores No Numerarios, interpretando los Estatutos de la UCM, en que reivindican, no solo estabilidad laboral, sino también la financiación necesaria para estabilizar las plantillas de profesorado contratado y potenciación de su actividad investigadora. Se pretende cambiar de régimen administrativo a laboral, en virtud de la legislación vigente. También se desea potenciar a los departamentos implicados en la docencia de la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos. Los PNNs anuncian huelga, los estudiantes desean examinarse en febrero y el decano debe tratar de mediar en el conflicto.

Ese año fallece prematuramente un gran profesor, D. Guillermo Folch. Deja un importante legado a la Fundación Folch y el problema inconcluso de la ubicación del Museo de la Farmacia Hispana. Se nombra como director en funciones al profesor Puerto.

El decano Doadrio, convoca nuevamente a la Comisión de Museo formada por 11 miembros, para buscar soluciones que permitan potenciar sus actividades y su mejor presencia en la sociedad. Desde entonces, personalmente, he estado vinculado a ese proyecto, especialmente por el cariño y amistad que el Profesor Folch, me profesó en vida.

En esas fechas, y ante la nueva situación estatutaria, se inicia la actividad de la Comisión de Biblioteca.

En sus últimas Juntas de Facultad, el decano Doadrio, aborda los criterios para la distribución del crédito, para la transformación o numerización del profesorado contratado, en función de las plantillas reales y carga docente de los distintos departamentos. Asimismo, se tendrá presente, la posible amortización de plazas, plan de estudios previsto, áreas de conocimiento, etc. La mayoría de los departamentos obtuvo alguna dotación.

El 25 de septiembre de 1987, el Dr. Doadrio preside su última Junta de Facultad, en que notifica el fallecimiento del Prof. Ángel Hoyos de Castro y la dimisión del Prof. Ruiz Amil. D. Antonio, se despide emocionado de su Junta de Facultad, agradeciendo la colaboración de sus componentes y del equipo de Administración y Servicios. También indica, que el Prof. José Luis Guillén Llera, como vicedecano más antiguo, asumirá la interinidad hasta la elección de nuevo decano.

En nombre de los miembros de Junta de Facultad, interviene el profesor Dr. D. Salvador Rivas Martínez, agradeciendo a D. Antonio su trabajo y esfuerzo para dirigir la Facultad de Farmacia.

Hemos visto a través de las ideas, que les he transmitido parte de la vida y obra de un hombre genial, buen profesor e investigador, que también dedicó mucho tiempo y esfuerzo a la difícil labor de gestión y dirección de una Facultad, que como suele calificar nuestro compañero Vicente Vilas, es el buque insignia de la Farmacia española.

A don Antonio Doadrio, le correspondió ser decano de una Facultad en permanente cambio, sabiendo bandear con acierto las épocas difíciles de la transición política y universitaria española.

Recogió y transformó su Facultad de Farmacia, logrando paz y tranquilidad, pues el sosiego permite cumplir a todos la doble misión docente e investigadora. Supo mantener el necesario equilibrio, entre la comunidad universitaria que le tocó dirigir, así como, armonizar las disciplinas básicas y farmacéuticas. Por tanto, existe una importante deuda de gratitud hacia el decano Doadrio.

Muchas gracias.

Don Antonio Doadrio, de una estirpe valerosa

María Teresa Miras Portugal

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excma. Sra. Doña María Rosa Villarejo, esposa de Don Antonio Doadrio.

Hemos escuchado palabras cargadas de emoción, hemos sentido como nuestras las vivencias de los oradores. Hemos descubierto nuevas facetas en una personalidad tan rica y labrada como la de Don Antonio.

Estaba previsto que uno de los oradores que glosaran la figura de Don Antonio fuera nuestro Presidente de Honor, Don Juan Manuel Reol, recientemente fallecido. Sé por sus propias palabras la admiración que le profesaba y sin duda en ese cruce de luz hacia otros destinos se habrán encontrado y se lo habrá dicho con las palabras más hermosas del sobrio castellano de Burgos.

Yo no tuve la suerte de tener a D. Antonio Doadrio como profesor, pues llegué a Madrid en cuarto curso de la licenciatura de Farmacia, pero he de reconocer que su figura elegante y esbelta, su aire distinguido, entre celta y suevo, que se correspondía con sus ascendientes galaicos, dejaba impronta.

Mis compañeros hablaban de sus clases y de su magisterio con cariño y admiración. Todos habían contraído deudas de las que no se pagan, ni nadie exige su pago, la deuda de la gratitud por el conocimiento.

Los avatares de mi periplo científico me alejaron pronto de la Facultad de Farmacia de Madrid. De este modo, años más tarde, al primero de los hijos de don Antonio que conocí fue a Juan Carlos, pues pertenecíamos al claustro de la Universidad Complutense. Más tarde en el año 2000, cuando tuve que organizar el congreso internacional "Purinérgico 2000" con muchos participantes y problemas, acudí a él en busca de ayuda, cuando ocupaba un elevado cargo en la Comunidad de Madrid.

Agradecí de todo corazón la ayuda económica concedida, pero hubo algo que agradecí si cabe más, y fue el descubrir su extensísima cultura, su profundo conocimiento del patrimonio artístico que poseía Madrid y su lucha titánica por conservar cada piedra o cada órgano antiguo de las iglesias más recónditas.

Al último que conocí fue a Ignacio, fue en Sevilla, en el palacio del pabellón de Perú, restos de la exposición universal de los años 20. Éramos miembros del jurado para una plaza de Investigador del Consejo para naturalistas del Parque de Doñana. Sus comentarios atinados, su humor, y el conocer todas las reglas del juego en donde lo de hoy prepara el mañana, me llamaron la atención, me di cuenta de que poseía una fina inteligencia y con los pies en el suelo de la realidad.

He dejado para el final a Antonio, Secretario de esta Real Institución, pues es entrañable amigo, trabajador infatigable, serio en todos sus actos, con una paciencia inagotable y además un excelente sentido del humor. Cualidad a la que hemos tenido que acudir en muchas e increíbles circunstancias. La Academia es deudora de su esfuerzo y de su buen hacer.

Ellos son la estirpe poderosa, en la que sus padres han unido la genética y la esmerada educación. Ellos son la gran obra de María Rosa. Ellos saben también que don Antonio, su padre, no les pertenece totalmente, que una parte de él es de esta Academia que solo existe y tiene sentido cuando personas con el carácter y la sabiduría de Don Antonio Doadrio López se integran en ella.

Permítanme que finalice estas escasas palabras de despedida con unos versos de Walt Whitman:

*No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños.*

No te dejes vencer por el desaliento.

*No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte,
que es casi un deber.*

No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.

Gracias Don Antonio por su extraordinaria vida dedicada a su familia a la Docencia y a la Investigación.

Descanse en paz.

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

MEMORIA DE SECRETARÍA CURSO 2008

Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2008

Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

La Real Academia Nacional de Farmacia inicia oficialmente sus actividades correspondientes al Curso 2008 con la Solemne Sesión Inaugural del 17 de Enero, contando en la Presidencia del Acto con el Presidente de las Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire y la Subsecretaria del Ministerio de Sanidad y Consumo, Señora Doña Consuelo Sánchez Naranjo, estando también presentes el Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, el Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina, la Directora General de Farmacia, la Directora del Instituto de Salud Carlos III y los Presidentes de los Colegios de Farmacéuticos de Castellón y de Madrid.

El discurso inaugural estuvo a cargo de la Excma. Señora Doña Ana M.^a Pascual-Leone Pascual, Vicepresidenta de la Corporación, que trató sobre el «Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario».

En el mismo Acto se hizo entrega, en nombre de S. M. el Rey, de la Medalla y Diploma de Académico Supernumerario a petición propia, al Excmo. Señor Don Guillermo Tena Núñez y de la Medalla de Oro Carracido al Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva. También, se hizo entrega a Doña Josefa Castellanos de una placa conmemorativa con motivo de su jubilación, agradeciéndole su dedicación y cariño para con esta Real Academia. Por último, se entregaron los Premios de Investigación del Concurso Científico 2008.

De nuevo, durante el año pasado ha tenido lugar la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación.

El 24 de enero, toma posesión de su plaza de Académico de Número, con la medalla 27, el Excmo. Sr. D. José Miguel Ortiz Melón, quien leyó su discurso titulado: “La especificidad en las vías de comunicación celular”. Le contestó en nombre de la Corporación la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto.

Apenas unas horas antes, se produjo el luctuoso suceso del fallecimiento de nuestro Académico de Número más antiguo, el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López, dándose la circunstancia de que fue el primer firmante de la candidatura del Prof. Ortiz Melón, por lo que se produce ese mismo día un simbólico relevo generacional entre el Académico más antiguo, que todavía de cuerpo presente entrega el testigo ante el más moderno, en un Acto presidido por la Presidenta de la Corporación.

En una histórica sesión celebrada en el mes de octubre, la Junta de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, presidida por su Decano, Ilmo. Sr. D. Rafael Lozano Fernández, decidió por unanimidad conceder a su edificio histórico el nombre de D. Antonio Doadrio López, que era su Decano Honorario en el momento de su fallecimiento, lo que agradecemos de corazón.

Se produjeron asimismo, siete tomas de posesión de Académicos correspondientes en Sesiones Públicas con las lecturas de sus discursos reglamentarios, de los Dres. Sergio Moreno Pérez, Premio Francisco Cobos a la investigación médica, que es el de mayor dotación económica que se concede en España y Juan Antonio Bueren Roncero, Jefe de la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del CIEMAT, con la asistencia del Director General de dicho organismo D. Juan Antonio Rubio Rodríguez, dentro del cupo de nacionales y por el de extranjeros, el Dr. Joaquim Alexandre Ribeiro, Director y Profesor del Instituto de Farmacología y Neurociencias en la Facultad de Medicina de la Universidad de Lisboa; la Prof. María Amelia Martins Louçao, Vice-Rectora de la Universidad de Lisboa, y Directora del Jardín Botánico y del Museo de Historia Natural de Lisboa; el Prof. Dr. Robert Langer, Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica y Premio Millenium 2008 y los Dres. Tadashi Goino de Japón y Rafael Ohanjanyan de Armenia. El Dr. Goino, en ese acto donó una valiosa colección de 500 grabados de pintura japonesa del arte antiguo Ukiyo-e en presencia del Presidente del Instituto de España, Excmo. Sr. D. Salustiano del Campo.

Además, el 19 de junio fue elegido Académico de Número el Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento. El Profesor Puerto, que es Catedrático de Historia de la Farmacia en la Universidad Complutense, humanista, escritor y columnista habitual de revistas farmacéuticas, ocupará la medalla nº 8 y el 18 de diciembre lo fue el Premio Nobel Erwin Neher como Académico de Honor de esta Corporación.

Otras irreparables pérdidas sufridas este año por la Corporación, son las debidas a los fallecimientos de nuestro Presidente de Honor, el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, el 9 de septiembre, que ocupó la medalla nº 23; de los Académicos Correspondientes nacionales Dres. Miguel Dean, Luis Carreras Matas y Pedro Malo García y extranjeros Dr. Ernesto Fernández Bernardo, Presidente de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile, de Károly Zalai, Académico Correspondiente extranjero de Hungría y del Premio Nobel de Fisiología o Medicina George E. Palade. También queremos hacer especial mención al Profesor Enrique Alcaraz Varó, coeditor de nuestro Diccionario Terminológico de las ciencias Farmacéuticas, fallecido el 26 de abril.

Homenajes póstumos a nuestros Académicos se celebraron en distintas Instituciones, llenas de sentimiento y respeto.

Así, la Junta de Gobierno del Ateneo de Madrid, en un acto celebrado el 4 de noviembre en su sede, impuso su Medalla de Honor a título póstumo a los Excmos. Sres. D. Juan Manuel Reol Tejada y D. Antonio Doadrio López y al Ilmo. Sr. D. Pedro Malo García, en recuerdo a su labor como ilustres ateneístas.

Por su parte, la Real Academia de Farmacia de Cataluña celebró en honor del Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada una sesión el 1 de diciembre, donde intervino la Presidenta de nuestra Corporación y la Real Academia Nacional de Farmacia celebró el preceptivo homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López el 16 de octubre.

La Actividad Científica, un año más ha rayado a gran altura. Se han celebrado 44 Sesiones Científicas semanales, superando en 8 las del 2007, distribuidas en 5 Tomas de Posesión, 14 conferencias, 8 Mesas Redondas, 3 sesiones necrológicas, 2 presentaciones de monografías de la Academia, 3 especiales dedicadas a Homenajes de grandes figuras farmacéuticas, 1 Jornada Científica y 6 Tertulias Científicas, además de

la Sesión Inaugural y la tradicional sesión conmemorativa de los Premios Nobel.

El servicio a la Sociedad que es guía de esta Real Academia Nacional de Farmacia, tiene una de sus máximas expresiones cuando impulsa actos de homenaje a ilustres farmacéuticos en colaboración con otras Instituciones científicas, culturales o sociales. Así, organizamos un homenaje a D. César González, con la Facultad de Farmacia de la UCM y una exposición de quinas, tan relacionadas con el Dr. González, que fueron cedidas por el Departamento de Farmacología de aquella Facultad, y a cuya Directora agradecemos su préstamo y del 29 al 31 de octubre, el Homenaje en el 250 aniversario del nacimiento de Vicente Cervantes, junto al Ateneo de Madrid, la Facultad de Farmacia de la UCM y el Ayuntamiento de Ledrada. Se da la circunstancia de que en un trabajo publicado recientemente en nuestros Anales por el Prof. Pastor Villegas se descubre que Vicente Cervantes nace en esa localidad de Ledrada, donde en esos actos se le nombra hijo predilecto.

En un año donde se cumplía el bicentenario del fallecimiento de José Celestino Mutis, no podía faltar una sesión conmemorativa, que celebramos el 11 de septiembre, uniéndonos a otros homenajes celebrados en su honor en la Real Academia Nacional de Medicina y en el Instituto de España.

Especial relieve tiene la Jornada sobre presentación de los “Estándares internacionales de la ISOPP para el manejo de antineoplásicos. La seguridad en el paciente oncológico”, que se encuadra dentro de un convenio de colaboración con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria.

El ciclo de Tertulias Científicas dedicado al Cambio climático, iniciado en 2007, finalizó con las 4 últimas destinadas a virosis animales, su origen extraterrestre, los cambios en el suelo y el golpe de calor. La tradicional Mesa redonda sobre Innovación y Medicamentos, este año ha tratado sobre: “La I+D de medicamentos en la empresa farmacéutica en España”, con las intervenciones de los Dres. Humberto Arnés, Director General de Farmaindustria, Javier Ellena, Presidente de Laboratorios Lilly y Pere Berga, Director de Gestión de I+D de Laboratorios Ammirall. Siguiendo con estos planteamientos de actualidad sanitaria, se celebraron las Mesas Redondas “Farmacología

y Terapéutica del Dolor” y “Novedades Farmacológico terapéuticas”. “Úlceras Gastroduodenal” coordinadas por el Excmo. Sr. D. Ángel M.^a Villar del Fresno; “La ley 14/2007 de investigación biomédica: reflexiones científicas y éticas”, coordinada por los Excmos. Sres. D. Juan Ramón Lacadena Calero y D. César Nombela Cano y “Ensayos clínicos: su problemática. Seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos. Variabilidad de las respuestas”, coordinada por la Excm. Sra. Dña. M^a del Carmen Avendaño López, que contó con la intervención de Dña. Cristina Avendaño Solá, Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y D. Jorge González Esteban, Director Médico de Merck Sharp & Dohme. Cerrando este capítulo de mesas redondas, en la última sesión del año celebramos una sobre “Salud, Farmacia y Ciencia durante la Guerra de la Independencia”.

Nuestra Institución tiene ya como tradición la de invitar a destacados profesionales sanitarios o de la Industria farmacéutica para impartir conferencias. En 2008 han intervenido los Dres. Eduardo Costas Costas, Catedrático de Genética de la UCM; Juan José Sanz del Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC); Salvador Cabrera de la Universidad Austral de Chile; Geesje M. Dallinga-Thie, del Laboratory of Experimental Vascular Medicine (medisin) Amsterdam, Holanda; Manuel Guzmán, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología de la UCM y María Molina Martín, Catedrática de Microbiología en la Facultad de Farmacia de la UCM.

En una Real Academia, también y sobre todo, prima el recuerdo a sus Académicos fallecidos, a los que dedicamos sesiones necrológicas de homenaje como muestra de respeto y gratitud. Así, se han celebrado en honor del Excmo. Sr. Eduardo Primo Yúfera, Académico de Honor y de los Excmos. Sres. D. Gregorio Varela Mosquera y D. Antonio Doadrio López, Académicos de Número.

Como es habitual, también en el curso 2008, se han impartido en la Corporación 2 Cursos del Tercer Ciclo, patrocinado por el Ministerio de Educación y Ciencia y coordinado por el Instituto de España, sobre Bases Moleculares del estrés oxidativo, y Aspectos biológicos, farmacológicos y toxicológicos de los iones metálicos.

En el pasado curso estrenamos una colaboración con la Universidad Complutense en forma de créditos de libre elección curricular, con el

desarrollo del I curso sobre Avances en Neurotransmisión, dirigido por la Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal y el Ilmo. Sr. D. Antonio Rodríguez Artalejo, impartido en nuestra Sede durante el mes de noviembre.

Esta enorme voluntad científica de servicio a la Sociedad, tiene su continuación in extenso, en el Capítulo de Publicaciones, editando 4 números de los Anales y otro extraordinario, dedicado al Balneario de Valdelateja, de la Comisión de Aguas minerales y minero medicinales, y 1 monografía, la n^o. XXIII: “Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas”, coordinada por los Académicos Ana M^a Pascual-Leone Pascual y José M^a Medina.

La Fundación Casares Gil como es habitual, vuelve a estar presente en estas actividades de la RANF, destacando el patronazgo de la monografía 23 y la publicación del n^o 6 de la colección Lecturas Singulares: “Breve historia de la experimentación animal” del Excmo. Sr. D. Alberto Giráldez Dávila.

Nuestra Academia ha hecho un gran esfuerzo económico en 2008 en su expansión informática, realizando tres importantes inversiones. Cronológicamente, la primera fue la adquisición de una potente estación de trabajo gráfica basada en Mac OS X Leopard para el modelado molecular, de tanta tradición en esta Corporación, seguida de la compra de un escáner en color de luz para la digitalización de los libros singulares depositados en nuestra Biblioteca sin que resulten dañados y por último, la adquisición de un nuevo software para compatibilizar nuestros registros de fondos bibliográficos con el sistema internacional de Bibliotecas Virtuales en Internet.

Dos importantes nuevos proyectos informáticos han visto su nacimiento en 2008, los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia on line en Open Journal y la Red Social de Enfermedades Olvidadas. Para introducir nuestros Anales on line, hemos elegido el proyecto Open Journal System, en el cual estamos plenamente integrados y que ha supuesto su indexación en la ISI Web of Knowledge y la asignación de un índice de impacto. La Red Social de Enfermedades Olvidadas, ha visto su luz con la discusión sobre la Malaria. El proyecto está promovido por las Academias de Farmacia de España e Iberoamérica y es un foro de encuentro entre investigadores e interesados en general, para el estudio de estas enfermedades que padecen millones de personas en

todo el mundo, estando insuficientemente estudiadas, y afectando generalmente a ciudadanos con pocos recursos económicos. La idea central del proyecto es que unidos se pueden hacer cosas importantes en este tema. Unión que se realiza con independencia de las posibilidades de cada investigador o grupo. Se trata también de dar visibilidad a grupos que están haciendo trabajos de importancia, y no disponen de los canales de difusión usuales. Se pretende fomentar la preparación de proyectos conjuntos competitivos, reuniones de trabajo y movimiento de investigadores.

La Real Academia Nacional de Farmacia hace ya tiempo que simbólicamente derribó sus muros y está realmente abierta a la Sociedad, haciendo ver y valer su labor con una extensión universal, recibiendo en su web una media de 500.000 visitas mensuales (6 millones al año).

Este hecho se corrobora con la firma de la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, María Teresa Miras Portugal y la alcaldesa de Cádiz, Teófila Martínez el 29 de enero en nuestra Sede, del convenio de colaboración entre la Ciudad de Cádiz y nuestra Academia que se refleja en la puesta en marcha del I Premio Nacional de Botánica "Celestino Mutis", dentro de la relación Cortes de Cádiz, cuyas bases de convocatoria fueron presentadas en el mes de diciembre.

Por segundo año consecutivo, hemos participado en FISALUD, celebrado en el recinto ferial del IFEMA en Madrid, del 27 al 30 de noviembre con un stand y un aula, dedicado a las mujeres académicas farmacéuticas, con el patronazgo de la Fundación José Casares Gil y de Caja Madrid.

Durante el año 2008, se han producido elecciones en los cargos de Tesorero, siendo reelegido el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, de Vicesecretario, en la persona del Excmo. Sr. D. José Miguel Ortiz Melón y de Presidentes de Sección. En las Secciones 2ª y 6ª fueron reelegidos los Excmos. Sres. D. Juan Ramón Lacadena Calero y D. Guillermo Giménez, respectivamente y en la 4ª y 5ª, han sido elegidos nuevos presidentes D. Juan Tamargo y D. Mariano Esteban, respectivamente, al cesar reglamentariamente por haber cumplido sus dos mandatos consecutivos, los Excmos. Sres. D. Ángel Villar del Fresno y D. Bernabé Sanz Pérez, a los que agradecemos sus desvelos en la dirección de sus Secciones.

Como años anteriores, organizaciones científicas y profesionales, han enriquecido nuestras actividades, con su presencia en nuestra Institución. El 15 de abril se celebró la entrega de los Premios AEFLA 2007, en un acto presidido por la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Presidente del Consejo General de COF, Ilmo. Sr. D. Pedro Capilla, así como por los Dres. José Felix Olalla, Presidente de AEFLA y Enrique Ordieres, Presidente de CINFA. La Fundación Abbott, en colaboración con nuestra Corporación, organizó el 22 de abril el acto de presentación de la Guía de Indicación Farmacéutica y Criterios de Derivación al Médico en Síntomas Menores, una herramienta que tiene como objetivo aumentar la efectividad, la eficiencia, la calidad y la seguridad de la atención que reciben los usuarios de farmacia y, de esta manera, contribuir a la mejora de la calidad asistencial en la farmacia comunitaria. El 27 de mayo la I Jornada sobre alergias alimentarias, patrocinada por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y el Instituto Tomás Pascual para la nutrición y la salud. El 3 de diciembre, en nuestra Sede, nuevamente el Instituto Tomás Pascual para la nutrición y la salud, organizó una conferencia sobre la importancia de los productos lácteos y el calcio en el control de la obesidad. Organizamos con la Fundación Casares Gil, y el patrocinio de Roche, el 12 de junio una Jornada sobre Presentación de los Estándares Internacionales de la ISOPP para el manejo de antineoplásicos. El 24 de junio, se presentó en nuestra Sede el libro: "Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos" del que es autor el Prof. Enrique Raviña Rubira, Académico Correspondiente de la RANF y el 2 de julio, se presentó el libro: "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs" del que son autores Dña. M^a del Carmen Avendaño López, Académica de Número y D. José Carlos Menéndez Ramos, Académico Correspondiente.

Nuestra Academia, también está abierta para colaborar en otros foros, fuera de su sede. De esta manera, nuestra Académica de Número Excma. Sra. D^a Ana M.^a Pascual-Leone, coordinó el curso "Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas", que se celebró en el Instituto de España del 19 al 22 de mayo. El 1 de Julio se celebró el Día de la Farmacia en el marco de la Exposición Internacional de Zaragoza y en el Pabellón de Zaragoza, con la intervención de nuestros académicos M^a Carmen Francés Causapé y Vicente Vilas.

Honores para nuestra Academia y nuestros académicos han sido concedidos durante el año 2008.

Destacar, que la Real Academia Nacional de Farmacia ha sido galardonada con el Premio a la mejor innovación farmacéutica 2007, por el Diccionario terminológico de ciencias farmacéuticas, del que es autor principal nuestro Académico Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, concedido por el Correo Farmacéutico. La Dra. María Cascales Angosto fue investida Doctor Honoris Causa por la UNED el 28 de enero. Al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva le ha sido concedida por la Comunidad de Madrid, la Cruz de Honor de la sanidad madrileña en su categoría de Oro. El Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia ha sido distinguido con el premio María de Maeztu a la Excelencia Científica otorgado por la Universidad de Salamanca en reconocimiento a su actividad investigadora. El Excmo. Sr. D. Benito del Castillo, Académico de Número, ha sido galardonado con la medalla de honor de la UCM. El Dr. Mariano Esteban Rodríguez, Académico de Número, ha sido nombrado Farmacéutico Ejemplar 2008, por la Junta directiva de la Asociación de antiguos alumnos de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela. Esta distinción le fue entregada el 1 de mayo en el Ayuntamiento de Paredes de Nava (Palencia). El Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo, Académico Secretario de esta Corporación, ha sido nombrado Académico Correspondiente electo de la Academia de Ciencias farmacéuticas de Chile. El Prof. Dr. Rafael Lozano Fernández ha sido elegido nuevo Decano de la Facultad de Farmacia de la UCM de Madrid. El Jurado del Primer Premio para la investigación en la mejora de la información al paciente sobre salud y medicamentos ha concedido el Premio Nacional al proyecto "Información y formación del paciente con VIH: intervención del farmacéutico de hospital" al Servicio de Farmacia del Hospital Universitario de Salamanca, que dirige nuestro Académico de Número Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, que fue presentado a la convocatoria realizada por la Oficina del Defensor del Paciente de la Comunidad de Madrid y la Compañía Merck Sharp & Dohme España. El 24 de mayo ingresó en la Cofradía Internacional de Investigadores de Toledo, nuestro Académico Correspondiente el Prof. Dr. José María Sánchez Montero. El 15 de septiembre tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente

de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega, Académico de Número de esta Corporación. El Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, Académico correspondiente, ha sido elegido Académico de Honor de la Real Academia de Medicina de Santa Cruz de Tenerife. La Excma. Sra. D^a M.^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de esta Corporación, ha sido nombrada Member of the "International Advisory Board Member" del Simposio "Purinergic signalling in the neuron and non-neuron communication", que tendrá lugar en Kioto (Japón) como parte del congreso de la International Union of Physiological Sciences, y del simposio satélite de Fukuoka (Japón). Además, ha sido galardonada con el Premio "María Wonenburger" de la Unidade de Muller e Ciencia en un acto celebrado en el Museo Pedagógico de Galicia. El Dr. José de Vicente González ha sido nombrado Académico Correspondiente de la Academia Iberoamericana de Farmacia y el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Bibliotecario de esta Academia, ha sido galardonado con la Cruz al Mérito militar con distintivo blanco, con la Medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de la UCM y con la Medalla al Mérito Académico de la UCM.

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

Un año mas, nuestros Académicos han conseguido grandes logros científicos. Así, el Dr. Mariano Esteban y su equipo de investigación desarrollaron una vacuna inhalada contra el SIDA y un equipo de investigadores de Nueva York y Barcelona, dirigido por nuestro Académico de Honor Excmo. Sr. D. Joan Massagué, ha abierto nuevas vías para luchar contra la metástasis del cáncer de mama, la expansión por el organismo de células tumorales que causa el 90% de las muertes por esta enfermedad.

Por último, tenemos que hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación, Política Social y Deporte por las subvenciones concedidas en el Curso 2008, que nos han permitido acometer las actividades programadas. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Fundación Ramón Areces, a todos los patrocinadores del Concurso Científico, y a los Patronos y miembros de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación y a

nuestro Académico de Número Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, por su continuado patronazgo.

Agradecer al Ministro de Asuntos Exteriores y Cooperación Miguel Ángel Moratinos, la donación de la colección de láminas botánicas de José Celestino Mutis y los volúmenes III, IV y V de la obra gráfica del Obispo Martines Compañón, “Trujillo de Perú”, editadas por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, en un acto celebrado en dicho Ministerio.

Una vez más, esta Real Academia Nacional de Farmacia, ha comparecido para dar cuenta pública de sus Actividades, de las que yo, el Secretario, doy fe.

Muchas gracias por su atención.

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO

Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

SESIÓN INAUGURAL CURSO 2009

Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2009



Mesa de la Presidencia (de izda. a dcha.): Don Manuel Díaz-Rubio García, Don Salustiano del Campo Urbano, Doña María Teresa Miras Portugal, Don Alberto Galindo Tixaire y Don Antonio Doadrio Villarejo.

El 15 de enero de 2009, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió de gran solemnidad. Presidieron el acto la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia. Junto a ella, el Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo Urbano; el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Señor Don Manuel Díaz-Rubio García y el Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Señor Don Antonio Luis Doadrio Villarejo.

De acuerdo con el Orden del Día, la Presidenta de la RANF hizo la salutación primero y explicó los éxitos obtenidos por la Academia en 2008. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2008. A continuación, la Excm. Señora Doña María del Carmen Francés Causapé leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre “Consideraciones sobre creencias, farmacia y terapéutica”.

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

El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades de D. Miquel Ylla-Català, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña; D. Isaac Arias Santos, Presidente de la Academia de Galicia; D. Alberto Ramos Comenzana, Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia; D. Francisco Rojo Vázquez, Subdirector General de Investigación y Tecnología del INIA (Ministerio de Ciencia e Innovación).

Clausuró el acto la Presidenta de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2009 en nombre de S. M. el Rey.

Discurso de Apertura del Curso 2009 de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmas. señoras y Excmos. señores Académicos, señoras y señores.

Mucha ha sido la historia acumulada por nuestra Academia en el año 2008 y el Sr. Académico Secretario dará cumplida cuenta en su memoria. Permítanme pues que haga solamente referencia a algunos aspectos muy precisos.

Nuestra corporación ha sufrido la dolorosa pérdida de dos Académicos de Número. El 24 de enero falleció el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López, ejemplo de buen hacer, querido, respetado y admirado maestro que dedicó su vida a enseñar e investigar y de cuyo magisterio queda memoria imborrable en todos los que han sido sus discípulos. El 9 de septiembre falleció el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, quien fue el anterior Presidente de esta Academia y era nuestro Presidente de Honor. Fue un luchador infatigable por un sistema coherente, dinámico y eficaz de la prestación farmacéutica y de la modernización del registro de especialidades farmacéuticas. Fue además uno de los artífices de la etapa modélica de la transición española. Fue, sobre todo, un Presidente carismático de esta Real Institución, haciendo de ella un lugar de encuentro y abierta a la sociedad. Nuestra Academia se siente legítimamente orgullosa de la intachable trayectoria vital de Don Antonio y de Don Juan Manuel, y sus actos son un legado para nuestra historia.

En el año que hemos finalizado se han impartido en nuestra Academia magníficas conferencias, mesas redondas y coloquios que nos han permitido profundizar en el conocimiento de las ciencias farmacéuticas y afines, muchas de ellas recogidas como artículos originales y revisiones en los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, contribuyendo a su mayor valoración y difusión en el mundo de las publicaciones científicas.

Hemos conocido de primera mano cómo la investigación básica ha puesto en evidencia la existencia de nuevas dianas que serán sin duda valiosas para el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas, sin olvidar las enfermedades infecciosas.

Hemos visto cómo se van imponiendo metodologías que permiten una aproximación visual al funcionamiento de células y tejidos, que parecen de ciencia ficción y que han sido galardonadas con el Premio Nobel de este año 2008.

Hemos asistido al descubrimiento de nuevos factores y genes que permiten la reprogramación celular de progenitores y células madre del adulto, lo que será de máxima utilidad en el futuro.

Nos hemos sorprendido con las novedosas técnicas de administración de fármacos ya disponibles y con las ventajas y mejoras que aportarán a la terapéutica las más avanzadas técnicas de ingeniería biotecnológica, expuesto de modo magistral por el Profesor Robert Langer en su toma de posesión como académico extranjero. Investigador, que para regocijo de esta Academia, ha sido el científico más galardonado mundialmente en el año 2008.

Sin duda hemos contribuido a cumplir la misión de llenar de esperanza la copa símbolo de nuestra profesión.

El año 2008 hizo que nos encontráramos de frente con celebraciones históricas. Arrastrábamos del año 2007 los 300 años del nacimiento del gran maestro de la sistemática de plantas, Carolus Linneus y siguiendo la senda botánica, en el 2008, hemos celebrado el bicentenario de la muerte del gran botánico español Celestino Mutis.

Por estas coincidencias de la historia en el año 2008, hemos homenajado a otro gran farmacéutico y botánico, Vicente Cervantes, participando activamente nuestra Academia en rescatarlo del olvido.

La conmemoración del bicentenario de la guerra de la independencia de 1808, nos hizo volver la vista atrás y hemos saboreado la etapa previa de la ilustración española, la gran epopeya de la recolección de especímenes y datos de valor incalculable, hazaña a la que Mutis y Cervantes, entre otros muchos y grandes botánicos, dedica-

ron vida e incluso fortuna. Por ello es necesario atraer la atención de los estudiosos hacia esa época luminosa de nuestra historia y en la que los farmacéuticos y botánicos desempeñaron un papel crucial.

La recuperación de este patrimonio cultural e histórico es una tarea fundamental de nuestra Academia y agradecemos sinceramente la donación del Ministerio de Asuntos Exteriores de los ejemplares de la flora de Celestino Mutis y los volúmenes de Martínez Compañón Truxillo de Perú que forman parte de nuestro fondo bibliográfico e histórico. De igual modo agradecemos la generosa donación del magnate japonés Tadashi Goino de una extensa colección de láminas de grabados Ukiyo-e que sin duda serán expuestas de modo conveniente en un próximo futuro.

Iniciamos en este acto solemne las actividades del nuevo año académico. ¿Cuáles serán los retos y desafíos de este año 2009? ¿Cuáles serán los hallazgos que permitan establecer nuevas hipótesis en las ciencias farmacéuticas? ¿Cuáles serán los paradigmas de nuestra ciencia que vean sacudido su ego y necesiten abrirse al debate y la experimentación?

Todos ustedes saben que este año celebramos el bicentenario del nacimiento de Charles Darwin y los 150 años de la publicación de su obra "El origen de las especies". Querámoslo o no la evolución sigue su curso sin pedirnos permiso, pero a corto plazo la cooperación para crear estructuras más estables, incluida la conducta altruista, que permiten una mayor supervivencia de sus individuos son los comportamientos favorecidos por la evolución. Como colectivo en nuestra Real Academia nos beneficiamos de ese patrón cooperativo altruista que nos permite buscar lo más conveniente para la institución, siendo todos artífices y estando todos y cada uno de la Académicos comprometidos con la difusión y avance de las ciencias farmacéuticas y afines.

Este es el único camino para encauzar la evolución permanente y necesaria de las ideas y conseguir que el 2009 sea tan estimulante científicamente como el 2008, y que nos sigamos entusiasmando y disfrutando con cada ponente que nos haga partícipe de su ciencia y de sus inquietudes.

Muchas gracias.

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

SESIONES CIENTÍFICAS

15 de enero

Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2009 de la Real Academia Nacional de Farmacia. Discurso reglamentario a cargo de la Excm. Sra. Dña. M.^a del Carmen Francés Causapé, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

22 de enero

Conferencia del Ilmo. Sr. D. Manuel Benito de las Heras, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, titulada: "Resistencia a insulina: ¿La puerta de entrada a la diabetes tipo 2?"

29 de enero

Presentación de la Monografía: "Redes de señalización y estrategias terapéuticas". Coordinada por los Excmos. Sres. Dña. María Cascales Angosto y D. José Miguel Ortiz Melón, Académicos de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

5 de febrero

Conferencia del Prof. Dr. Antonio Vicente Ferrer Montiel: "Inflamación Neurogénica: Mecanismos y Oportunidades Dermocosméticas".

12 de febrero

Conferencia de la Prof. Dra. Mercedes Salaices Sánchez, Catedrática de Universidad, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM, titulada: "Hipertensión y producción vascular de mediadores inflamatorios". Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Ángel M.^a Villar del Fresno, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

19 de febrero

Toma de Posesión como Académico de Honor del Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini, Instituto de Química Médica del CSIC, quien leyó su discurso titulado: "La Farmacia y la Química: Un país, dos

culturas”. Le contestó en nombre de la Corporación la Excma. Sra. Dña. M.^a del Carmen Avendaño López.

26 de febrero

Toma de Posesión como Académico de Número del Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, quien pronunció su discurso titulado: “La Triaca Magna”.

5 de marzo

Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada. Con la intervención de los Excmos. Sres. Académicos de Número, D. César Nombela Cano: “Juan Manuel Reol, una época de la farmacia española”, D. Víctor Jiménez Torres: “Juan Manuel Reol en la cercanía”, D. Antonio L. Doadrio Villarejo: “Juan Manuel Reol, el Académico” y Dña. M.^a Teresa Miras Portugal: “D. Juan Manuel: un líder para una época”.

12 de marzo

Tertulia Científica sobre “La década prodigiosa de las células troncales (1998-2008) y la alquimia celular”. Ponente: Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número.

Conferencia por la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número, titulada: “Dieta y Longevidad”.

18 de marzo

Acto conjunto de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación Ramón Areces. Conferencia sobre Malaria del Dr. Pedro Alonso, Premio Príncipe de Asturias de Cooperación Internacional. Fue presentado por los Académicos de Número, Excmos. Sres. D. Mariano Esteban Rodríguez, en nombre de la RANF y D. Federico Mayor Zaragoza, en nombre de la Fundación Ramón Areces.

NOTICIAS

El 18 de diciembre fue reelegido en el cargo de Tesorero el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

* * * *

El 18 de diciembre fue elegido Académico de Honor de esta Corporación el Premio Nobel Erwin Neher.

* * * *

La Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia Excma. Sra. D.^a M.^a Teresa Miras Portugal ha sido galardonada con el Premio “María Wonenburger” de la Unidade de Muller e Ciencia en un acto celebrado en el Museo Pedagógico de Galicia.

* * * *

El pasado 12 de Enero, en la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo lugar el Acto de Clausura del curso 2007-2008, presidido por el Ilmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá. Completaban la mesa presidencial D. Javier Fdez. de la Peña, Director de Ephos y como invitado especial D. Javier Ellena, Director General de Lilly. Cabe destacar la amplia representación de instituciones relacionadas con el Sector y con la actividad educativa de Ephos: Profesores de la Universidad y la Industria Farmacéutica y representantes cualificados de las empresas asociadas: Lilly, MSD, Roche Farma y Janssen Cilag, así como de AEFI, AMIFE, COFM, BRITISH COUNCIL, CONTENIDOS DE SALUD Y NEXUS.

* * * *

La Academia de Farmacia de Galicia celebró el 21 de enero un Acto Homenaje a nuestro fallecido Presidente de Honor Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada.

* * * *

El 27 de enero en nuestra Sede se entregaron los VIII Premios de la Asociación Española de Derecho Farmacéutico.

* * * *

La Fundación Alicia Koplowitz, de la que es Coordinadora de programas, nuestra Académica Margarita Lorenzo Balado, ha convocado unas interesantes becas y ayudas de formación para el 2009. Consultar su web.

* * * *

El Prof. Salvador Rivas Martínez, Académico de Número ha sido galardonado con el I Premio “José Celestino Mutis” del Ayuntamiento de Cádiz.

* * * *

El Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini, ex Presidente del CSIC, tomó posesión el pasado jueves 19 de febrero en Sesión Solemne de una plaza de Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia. El Dr. Elguero leyó el discurso de ingreso “La Farmacia y la Química: Un país, dos culturas” que fue contestado por la Académica de Número D^a. Carmen Avendaño. El Dr. Elguero es el sexto Académico de Honor de la Corporación, siendo el máximo de diez.

* * * *

El Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Catedrático de Historia de la Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid tomó posesión el pasado jueves 26 de febrero en Sesión Solemne de la medalla nº 8 de la Real Academia Nacional de Farmacia. El evento, estuvo presidido por la Presidenta de la Corporación Doña María Teresa Miras Portugal; el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Física y Naturales, Don Alberto Galindo Tixaire; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Don Manuel Díaz-Rubio García; y el Senador, Don Luis Peral Guerra. El Dr. Puerto leyó el discurso de ingreso “La Triaca Magna” que fue contestado por el Académico de Número D. Antonio L. Doadrio Villarejo, Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia.

* * * *

Del 2 al 12 de marzo de 2009 se impartió en el Instituto de España el Curso Avances en Neurociencias, coordinado por la Excma. Sra. D^a M.^a Teresa Miras Portugal.

* * * *

En la Sede de la Real Academia Nacional de Farmacia, se firmó el lunes 16 de marzo, un importante convenio marco de colaboración entre nuestra Corporación, el Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, fruto del cual se realizarán jornadas en la Real Academia Nacional de Farmacia sobre temas sanitarios, especialmente orientados al campo de la nutrición, y dirigidos a colegiados farmacéuticos y científicos interesados en el tema. Firmaron el acuerdo: D^a María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, D. Alberto García Romero, presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y D. Ricardo Martí Fluxá, Presidente del Instituto Tomás Pascual Sanz.

* * * *

NOTICIAS DE LA BIBLIOTECA

Giftmischer, Exzentriker, Bieddemänner Das Bild des Apothekers in Prosa un Lyrik der Frühen Neuzeit bis zur Gegenwart.- Mükker-Jahncke, Wolf-Dieter.- 2009.- Govi-Verlag.- Eschborn.- 195 pág.- ISBN: 978-3-7741-1098-4.

En esta obra el Prof. Wolf-Dieter Müller-Jahncke, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y Presidente de l'Académie International d'Historie de la Pharmacie, da cuenta de una serie de citas breves y raras dedicadas a los farmacéuticos, tanto en prosa como en verso, desde la más temprana época hasta la actualidad. A través de ellas se plasma la imagen del farmacéutico y de la profesión farmacéutica en la literatura bien se trate de comedias, dramas, piezas satíricas, poesías, cancioneros infantiles o canciones.

El texto se ha distribuido en nueve apartados en los que en total se incluyen sesenta citas seleccionadas correspondientes a obras de diferentes autores y de dos anónimas más un epílogo que incluye una cita humorística de una obra también anónima. La mayor parte son textos de lengua alemana, aunque no todos los autores sean alemanes; sin embargo se incluyen siete que corresponden respectivamente uno en lengua inglesa a William Shakespeare, dos en lengua francesa a Jean Baptiste Molière y Charles Baudelaire, uno en lengua española a Pablo Neruda, uno en lengua rusa a Alexander Alexandrowitsch Block, y dos en lengua latina a Michael Barth y Heinrich Cornelius Agrippa von Nettesheim.

Los nueve apartados se dedican el primero, que es el más extenso, a la farmacia y a su vez se halla estructurado en tres subapartados que comprenden respectivamente textos datados entre el siglo XIV y el siglo XVIII; textos del siglo XIX y textos del siglo XX y XXI. El segundo se refiere al personal de la farmacia, el tercero a las farmacéuticas, el cuarto a los aprendices de farmacia, el quinto a las guardias nocturnas en las farmacias, el sexto a reminiscencias, el séptimo a personalidades, el octavo a cancioneros infantiles y el noveno a piezas satíricas y canciones.

Tras los textos en prosa y en verso, que ocupan de la página 13 a la página 132, se incluyen las explicaciones correspondientes a los mismos en cuanto a sus autores, títulos de las obras de las que for-

man parte así como las oportunas referencias bibliográficas. Todo ello se expone desde la página 133 a la 184.

El libro se completa con un prólogo del autor, sus agradecimientos hacia los autores en cuyas obras se inspiró para su realización así como hacia las personas que le han ayudado de alguna manera durante el proceso de realización del mismo y en particular a Kathrin V. Pfister, que se ha encargado de la supervisión durante el proceso de publicación; la relación de la bibliografía consultada así como de los textos bibliográficos básicos utilizados y por último un índice alfabético de los autores cuyos textos incorpora el libro que además facilita la consulta al lector interesado.

Como es costumbre en el Dr. Müller-Jahncke, la lectura de este libro nos muestra una vez más su extraordinaria personalidad a través de una de sus múltiples inquietudes intelectuales en el campo de la Historia de la Farmacia, en este caso particular en relación con la cultura literaria, por lo que este libro, publicado de forma elegante y exquisita, es muy recomendable al lector interesado en estos temas.

MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

