

La gripe A/H1N1(2009) y su tratamiento: Resumen de sus principales aspectos

José Antonio Cabezas Fernández del Campo *

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca.
Recibido el 12 de marzo de 2010.

RESUMEN

A mediados de marzo de 2009 se temía la aparición de una nueva epidemia (o pandemia) de gripe que se esperaba pudiera proceder del subtipo A/H5N1 causante de la gripe aviar. Pero surgió, inesperadamente en Méjico y enseguida se propagó a EE.UU. y al resto del mundo, una «nueva gripe», de origen porcino, resultante de un complejo **agrupamiento de segmentos de genes** (no por mutación) cuyo origen pronto se averiguó que era el siguiente: 1/3 procedente del aviar de América del Norte, otro 1/3 del porcino de igual procedencia, y el aproximadamente 1/3 restante integrado a partes iguales por los de origen humano y porcino de procedencia eurasiática.

Realmente, **lo «nuevo» de este virus** no era el subtipo —que es el mismo de la famosa pandemia de 1918-19 (la impropia e injustamente llamada «gripe española») —, sino el continente de su origen (América del Norte, no Asia); también, la estación del año de su aparición (la primavera, en lugar de finales del otoño); y, finalmente, la mayor letalidad en jóvenes, respecto al virus H1N1 causante de la gripe estacional, aun siendo su mortalidad no superior estadísticamente a la causada por éste.

Dada la complejidad génica del «nuevo» virus, se pensó, lógicamente, que no existiría inmunidad significativa en los seres humanos respecto a él; pero en el otoño de 2009 se ha publicado que sí hay cierto grado de **inmunidad**, previamente adquirida, en algunos sectores de población, dependiendo de la edad.

Pronto se organizó internacionalmente **la preparación de vacunas** adecuadas, optándose por utilizar las técnicas tradicionales con huevos de gallina, preferentemente con virus inactivados, y usándose en la mayoría de ellas adyuvantes que incrementan su poder inmunógeno.

En España, a mediados de noviembre de 2009, se inició la campaña de vacunación, estableciéndose una prioridad para los denominados «grupos de riesgo». De forma sorprendente, la aceptación de la vacunación ha sido menor de la esperada, incluso entre el personal sanitario (e igual ha sucedido en Francia).

También se consideró conveniente prever la utilización adecuada (restringida a casos graves de hospitalizados, para evitar la aparición de cepas resistentes) de **los agentes antivirales oseltamivir (tami-flu) y zanamivir (relenza)**, los cuales interrumpen el ciclo biológico del virus por inhibir la enzima de éste llamada neuraminidasa (o sialidasa), cuya actividad es indispensable para la liberación de los viriones recién formados de la superficie externa de la dañada célula hospedadora.

A la vista de la comprobada benignidad de la temida pandemia, a comienzos del año 2010 **se ha estimado por ciertos sectores (también algunos sanitarios) que se había exagerado por parte de los organismos internacionales responsables el riesgo de la misma**, achacando tal actuación a los intereses de las compañías farmacéuticas fabricantes de vacunas.

Los responsables de los organismos oficiales han acreditado que las medidas adoptadas eran las razonables ante un peligro desconocido, que aún no está desaparecido y que puede incluso aumentar si resultaran cepas más patógenas por mutación o por reagrupamiento del «nuevo» virus con el H5N1, causante de la gripe aviar, o con el H9N2. Consideran que con las medidas tomadas se han evitado los errores cometidos en 1918-19, en que (además de

carecerse de los conocimientos y recursos actuales) se intentó luchar con remedios ineficaces, y con un exceso de confianza y engaños a la población.

Palabras clave: Gripe A/H1N1; Gripe A/H1N1(2009); Gripe A; Gripe porcina; Gripe «mexicana»; Pandemia de gripe; Vacunas contra la gripe A; Oseltamivir; Tamiflu; Zanamivir; Relenza.

ABSTRACT

The influenza 2009 A(H1N1) and its treatment: A summary of its main features

At the middle of March 2009 an A(H1N1) emerged whose genome contains segments that are about one-third from «old» North American swine influenza, one third from North American avian, and the remaining third evenly divided between eurasian swine and human origin.

The new modality of influenza emerged initially in Mexico and immediately after in United States of America; its propagation in many other countries on several continents has been very rapid.

Actually, what «was new was not just the virus but also the continent origin (North America, not Asia), the season of origin (spring, not late fall), and the cohort at risk for infection and death (children and young adults, not infants and the elderly)».

Contrary to earlier speculation, it seems that a certain level of immune protection against the new influenza A(H1N1) virus has been previously acquired by some sectors of population, depending on age.

Vaccine production was internationally organized. Most licensed flu vaccines consist of inactivated egg grown virus, then purified and generally adjuvants added.

Furthermore, the neuraminidase (= sialidase) inhibitors oseltamivir (Tamiflu) and zanamivir (Relenza) have been used in treatments, mainly in children, at the hospitals. The risk of appearance of resistant strains advised cautious dispensation.

Certain people considerer that perhaps some official sanitary authorities have been influenced by pharmaceutical companies to deliver an exaggerated message about the risk of this pandemics and have helped to intensify the vaccination campaigns. However, they argued that the risk of a reassortant virus containing segments of avian H5N1 or H9N2, which could result in chimaeric viruses with very dangerous characteristics, should be avoided with preventive vaccination and the use of antiviral agents.

Key words: Influenza A(H1N1); Influenza 2009 A(H1N1); Influenza A; Swine influenza A(H1N1); Swine flu; Schweinegrippe; Mexican flu; California flu; American flu; Pandemics influenza; Vaccines against influenza; Oseltamivir; Tamiflu; Zanamivir; Relenza.

* * *

La prestigiosa revista *Science* de 20-3-2009 mostraba la figura de un hombre cubierto por un paraguas para protegerse de una lluvia de virus de la gripe, y debajo aparecía la frase: ***Preparándose para una tormenta de virus.***

Verosímilmente, aludía esta imagen al temido peligro de la entonces esperada gripe aviar. Sin embargo, la que surgió en esas mismas fechas (el 18-3-2009) fue una «**nueva gripe**», distinta de la aviar, en Méjico, que pronto se extendió al Estado norteamericano de California. Estas circunstancias pudieron determinar el que se la denominara inicialmente *gripe mexicana* (*Mexican flu*), *gripe americana* (*American flu*), *gripe californiana* (*California flu*); y, en razón a su procedencia animal inmediata, *gripe porcina*.

Pero, para evitar celos con posibles vinculaciones patrióticas no gratas —como ocurrió lamentablemente en 1918-19 con la injusta y erróneamente llamada «gripe española»— y para evitar el previsible descenso en el consumo de productos de cerdo, se acordó por los Organismos Internacionales denominarla ***Influenza 2009 A(H1N1)***; en español: ***gripe A/H1N1(2009)***. También se han ido aceptando expresiones simplificadas como ***gripe A/H1N1*** (que puede inducir a confusión con la de 1918-19); e incluso otras menos precisas, como ***gripe A***, o «**la nueva gripe**».

Se apreció enseguida la rapidez de su propagación, que determinó la declaración por la Organización Mundial de la Salud, OMS, en junio de 2009, de **fase pandémica**; aunque esto no significaba el que fuera especialmente mortífera. En efecto, pronto se dedujo que su gravedad no era superior a la de la gripe estacional, que causa numerosos fallecimientos cada año. No obstante, el 7-8-2009 se contabilizaban 1.321 muertos (procedentes mayoritariamente de Méjico, seguido de EE.UU., aun cuando aquí el número de afectados había sido bastante más elevado que en el país azteca); el 6-9-2009 la cifra se elevaba a 5.712; y el 30-12-2009 a 11.516.

La revista *New England Journal of Medicine* del 12-11-2009 señalaba que «**lo que es “nuevo” de la «nueva gripe»** no es el subtipo de virus, sino el continente de origen del virus (América del Norte, no Asia), la estación del año en que se origina (la primavera, no finales del otoño), el [mayor] riesgo de infección y muerte (en niños y adultos jóvenes, no en bebés y ancianos)».

Con gran rapidez y eficacia se determinó por los organismos competentes (principalmente de EE.UU.) **la filogenia genética** de la variante en cuestión; la cual resultó ser inesperada y compleja en su composición. Por el mecanismo de *reagrupamiento* génico (*reassortment*) —que no es propiamente «recombinación» ni «mutación» sino el resultado de una integración de segmentos de genes de variada procedencia— se halló que el virus causante de «la nueva gripe» contenía genes de gripe aviar de América del Norte (34,4%), correspondientes a la *polimerasa básica 2* y a la *polimerasa ácida*; de la «clásica» porcina de América del Norte (30,6%), relativos a la *hemaglutinina*, *nucleoproteínas* y *proteínas no estructurales*; y aproximadamente el 1/3 restante, distribuido a partes iguales, entre los de procedencia humana (17,5%), correspondiente a la *polimerasa básica 1*, y los de origen euroasiático (17,5%), vinculados con la *neuraminidasa* (= *sialidasa*) y *proteínas matriz de la envoltura* (según Cohen, *Science*, 8-5-2009). También se dedujo que el intercambio de algunos de estos segmentos génicos se había producido años atrás en distintas épocas.

La novedad y complejidad de esta variante del subtipo A/H1N1 hizo pensar inicialmente que se carecería por parte de los seres humanos de **inmunidad** respecto a ella. Sin embargo, según la re-

vista *Proceedings of the National Academy of Sciences* del 1-12-2009, sí existiría alguna inmunidad previa en ciertos sectores de población (dependiendo de la edad).

Se han hallado **diferencias entre la patogenicidad de esta variante y la de la causante de la gripe estacional**, aun perteneciendo ambas al mismo subtipo. Al igual que el virus de la gripe estacional, el pandémico infecta las cavidades nasales de hurones, pero sólo éste penetra fácilmente en los pulmones (*Science*, 3-7-2009). Ello puede ser debido a que el primero se introduce en las células de las vías respiratorias superiores, enlazándose con los glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) que en su extremo terminal llevan el ácido *N*-acetilneuramínico unido a la galactosa por enlace $\alpha 2-6$, mientras el virus de la gripe pandémica penetra en las células del tracto respiratorio inferior, que son ricas en uniones $\alpha 2-3$ (*Nature*, 12-11-2009).

Asimismo, la peculiar patogenicidad de este último puede verse favorecida por la estructura de la neuraminidasa resultante del nuevo reagrupamiento génico (*Nature Biotechnology*, 11-2009).

¿Podría convertirse en más letal este virus?

Se sigue investigando si el altamente transmisible virus A/H1N1 pandémico podría originar (por reagrupamiento con el A/H5N1 aviar) una variante con las peores propiedades de ambos, que son la gran capacidad de transmisión del H1N1 y la gran letalidad del H5N1. También podría hacerlo, hipotéticamente, con otras variantes.

Por otro lado, la Agencia de la ONU para la Agricultura y la Alimentación (FAO) informó a finales de agosto de 2009 de que las autoridades de Chile alertaron, el 20-8-2009, de la existencia de pavos en dos granjas avícolas contagiados por una cepa pandémica del H1N1 (2009), idéntica a la que circulaba entre los humanos (recuérdese que, hasta entonces, se consideraba que sólo los humanos y los cerdos habían sido afectados por dicha cepa H1N1).

¿Qué remedios se han venido aplicando para prevenir o tratar esta gripe?

La mayor parte de los siguientes, con más o menos intensidad (bajo el asesoramiento y control de los Organismos correspondientes, tales como OMS, FAO, Ministerios de Sanidad respectivos, centros de investigación públicos y privados):

- Información internacional y nacional, no alarmista pero tampoco engañosa (como sucedió en 1918-19).
- Utilización (*mutatis mutandis*) de una estrategia basada en los medios preventivos y recursos terapéuticos potencialmente preparados para la temida pandemia prevista de gripe aviar, que hasta ahora no se ha producido; entre los que se hallan:
 - activación de las redes de alerta internacionales;
 - preparación de vacunas, no dependiendo solamente de la disponibilidad de huevos de gallina sino pudiendo utilizar cultivos celulares;
 - fabricación incrementada de antivirales (inhibidores de la neuramidasa), los cuales son de fácil conservación (a diferencia de las vacunas);
 - planes de distribución, entre todos los países necesitados, de vacunas y/o antivirales;
 - disponibilidad, en países pobres, de fármacos como las estatinas, que pueden paliar la carencia de vacunas o antivirales, sustituyéndolos (véase Cabezas, J. A., 2009a).

En relación con las **vacunas**, el temor a la aparición de la gripe aviar había aconsejado a las autoridades sanitarias internacionales prever la posibilidad de tener que fabricar estas herramientas preventivas con más rapidez que la habitual elaboración anual de las destinadas a la gripe estacional. Por ello, a mediados de mayo de 2009 (*Nature*, 13-5-2009) se habían tomado medidas por el «Grupo Asesor Estratégico de Expertos sobre Inmunización de la OMS» en cuanto a capacidad global de fabricación de dosis.

Se dudó de si sería conveniente seguir aplicando los métodos tradicionales de fabricación de vacunas o si sería preferible utilizar

otros, más rápidos pero menos comprobados, como los que utilizan cultivos celulares. También se analizó lo relativo al uso para vacunas de virus atenuados o inactivados, o los fragmentos de éstos, así como el empleo o no de adyuvantes que incrementan el poder inmunógeno (economizando las dosis vacunales).

En general, se ha optado por las experimentadas técnicas tradicionales para fabricar las vacunas con virus inactivados, llevando además frecuentemente adyuvantes, salvo en este caso las destinadas a embarazadas y niños (datos adicionales y sobre otros tipos de vacunas pueden encontrarse en Cabezas, J. A., 2009a; y en la página www.ranf.com).

Hacia finales de julio de 2009, **España había contratado la adquisición de 37 millones de dosis de vacuna** a los principales laboratorios fabricantes extranjeros, ya que aquí hasta ahora no se hacen, previendo vacunar (mediante dos dosis) a un 40% de la población.

Ante la eventual escasez de vacuna o necesidad urgente de vacunación, se establecieron unos grupos de riesgo, integrados por: enfermos crónicos graves (con problemas cardiovasculares o respiratorios, insuficiencia renal, etc.); niños hasta catorce años (unos 6,5 millones); embarazadas (aproximadamente medio millón al año); profesionales sanitarios y trabajadores de servicios esenciales (unos 4,5 millones); a ellos se añadieron ulteriormente los de otras profesiones.

Comparando con lo acordado por **otros países**, se deduce que han existido notables diferencias en este asunto entre unos y otros. Así, Australia previó la necesidad de 21 millones de dosis, con objeto de poder vacunar a toda la población. (Téngase en cuenta que, al hallarse situada en el hemisferio austral, su riesgo de sufrir una gripe favorecida por el invierno no era coincidente con la del hemisferio norte, y podría sufrir una oleada más peligrosa.) Retrospectivamente puede ahora comprobarse que la amplia utilización allí de la vacuna y de antivirales ha evitado las grandes pérdidas (humanas y económicas) que lamentablemente sí se han producido en otros países sureños como Argentina, donde no se aplicaron tan intensamente estas medidas.

También el Reino Unido (donde se habían presentado enseguida, después de en Méjico y EE.UU., algunos casos de infección) concertó

una amplia vacunación para atender al 75% de la población, con 90 millones de dosis.

En Francia, para vacunar ese mismo porcentaje, 75%, se necesitó reservar 94 millones de dosis; mientras que en EE.UU. se previó vacunar el 50% de la población (preferentemente embarazadas, niños y ancianos), destinando a ello 160 millones de dosis.

Italia, dando prioridad asimismo a adultos y ancianos, estableció el mismo porcentaje de vacunación que España, el 40%, con 48 millones de dosis. En cambio, Alemania consideró conveniente vacunar únicamente el 25% de su población, con 48 millones de dosis.

Respecto a otros continentes, algunos ejemplos son: China, que ha actuado con gran rapidez en su campaña de vacunación, aunque parece ser lo haya hecho con un número relativamente bajo de dosis (90.000); Sudáfrica, empleando sólo antivirales; e India, sin intentar amplias campañas.

¿Por qué numerosas personas (del ámbito sanitario en gran proporción) no se han vacunado, frente al virus A/H1N1 pandémico?

En España —donde ha estado disponible la vacuna en los centros adecuados desde el 15-11-2009— ha habido sólo un limitado interés en ser vacunado incluso el personal sanitario. Situación similar se ha producido en Francia. ¿A qué puede ser esto debido?:

¿A la frecuente indiferencia y hasta escepticismo por parte de algunos profesionales sanitarios a aplicarse a sí mismos las medidas (preventivas o terapéuticas) que prescriben o recomiendan a sus eventuales pacientes o conocidos?

¿A la idea, en parte confirmada, de que algunos sectores de población mantienen cierta inmunidad, aunque sólo sea parcial, originada después de infecciones similares anteriores?

¿Ha podido contribuir a este desinterés el temor a que una acelerada producción de esta vacuna hubiera ocasionado la producción de ella sin todas las garantías que sí se cumplen para la elaboración de la vacuna de la gripe estacional, con la posibilidad de originarse situaciones como las que causaron inesperadamente el síndrome de

Guillain-Barré, en 1976 (en 1 entre 100.000 vacunados), que obligó a interrumpir por completo aquella amplísima campaña de vacunación en EE.UU., que estaba haciéndose con la vacuna A/NJ/1976/H1N1 de «gripe porcina» (*Journal of Infectious Diseases*, 15-7-2008)?

Recuérdese que dicho **síndrome de Guillain-Barré**, de origen desconocido y poco frecuente, afecta al sistema nervioso ocasionando una parálisis flácida, que viene precedida por episodios de infección respiratoria o gastrointestinal, estimándose que en su producción participan mecanismos autoinmunes.

Según el citado trabajo del *J. Infec. Dis.*, los responsables de la aparición de este síndrome pueden ser anticuerpos contra el gangliósido GMI. Probablemente, «los bajos niveles de neuraminidasa viral de la vacuna de 1976 pudieron permitir que una cantidad suficiente de ácido siálico permaneciera unido a la hemaglutinina viral, formando un complejo ácido siálico-hemaglutinina que mimetiza al gangliósido GM1».

Si las vacunas constituyen el principal remedio, de tipo preventivo, contra la gripe, se dispone desde hace pocos años de dos agentes terapéuticos oficialmente autorizados —y existe otro próximo a serlo probablemente—, que son el **oseltamivir** (comercialmente conocido como Tamiflu) y el **zanamivir** (Relenza). Son fármacos que pueden curar la gripe ocasionada por los virus de tipo A, si se inicia el adecuado tratamiento en las primeras 48 horas de haberse producido la infección. Se ha comprobado la aparición de alguna cepa resistente a estos medicamentos; por lo que se recomienda el uso restringido de los mismos, sólo para casos necesarios y no para la gripe estacional.

Actúan como inhibidores de la enzima del virus neuraminidasa (= sialidasa, E. C. 3.2.1. 18), interrumpiendo el ciclo biológico de éste al impedir la liberación de los viriones recién formados de la superficie externa de la dañada célula hospedadora; por lo que éstos quedan arracimados sobre dicha superficie (datos sobre la estructura química y mecanismo de acción de ambos agentes se detallan en el capítulo de Cabezas, J. A., de la monografía número XXI de la RANF, véase Bibliografía).

Un trabajo aparecido durante el verano pasado en la revista *British Journal of Medicine* (3-8-2009) hacía dudar de los beneficios del Tamiflu en cuanto al tratamiento de la gripe estacional, e insinua-

ba que respecto a la cepa A/H1N1 pandémica «aún quedaba por ser determinados».

Pocas semanas después, el 14-9-2009, otro artículo publicado en la misma revista por personal de Roche (laboratorio fabricante del producto) señalaba que el Tamiflu es un fármaco «eficaz y bien tolerado por los niños».

Independientemente de esta publicación, otra, aparecida en *New England Journal of Medicine* el 24-12-2009, confirmaba las ventajas del uso del oseltamivir en pacientes de gripe pandémica hospitalizados en China, a condición de comenzar su empleo tempranamente. (La independencia de los autores de este artículo respecto a los fabricantes del producto viene a reforzar el testimonio del anterior, vinculado al fabricante, demostrando la **utilidad del oseltamivir frente a la gripe pandémica.**)

En España, en relación con este fármaco, las autoridades del Ministerio de Sanidad han confiado al **Centro Militar de Farmacia de la Defensa**, situado en Burgos, la preparación de 1,2 millones de dosis para eventuales tratamientos; y se han elaborado allí envases de 30 comprimidos a partir de 1.656 kilogramos de fosfato de oseltamivir. (Es sabido que los Servicios Farmacéuticos Militares gozan, desde muchos años atrás, de un merecido prestigio en la preparación de eficaces medicamentos a bajo coste.)

Por otro lado e independientemente de todo lo anterior, quizá convenga indicar brevemente que, en enero de 2010, se ha intensificado en la prensa española una **campaña en contra de la vacuna destinada a la protección frente a la pandemia gripal**, atribuyendo a las empresas farmacéuticas internacionales fabricantes de la misma —conocidas con la imprecisa denominación de «las farmacéuticas»— presiones no sólo sobre los autores de artículos en revistas especializadas sino también sobre miembros de Organismos internacionales responsables de la salud, para exagerar la peligrosidad de la pandemia y así favorecer la producción y venta de dicha vacuna. La benignidad, hasta la fecha, de la temida pandemia ha contribuido a estas manifestaciones, procedentes en algunos casos asimismo del ámbito sanitario.

Así, han aparecido titulares como: «El gran fiasco de la gripe A», seguido de frases como: «Tras el susto llega el escándalo. El Consejo

de Europa empieza este jueves una investigación para determinar si la declaración de pandemia por parte de la OMS estaba justificada y si ha habido intereses económicos tras la campaña de vacunaciones masivas. [...] En el centro de la polémica se encuentra un virólogo de fama mundial que ha estado detrás de todas las alertas sanitarias de los últimos años: el holandés Osterhaus, al que ya llaman “el doctor Gripe”» (*XL Semanal*, 24-1-2010).

También otra publicación del mismo día pone el siguiente título: «El camelo de la gripe A»; y añade: «Nos han tomado el pelo» (*EL MUNDO*, 24-1-2010). Este mismo periódico, el 27-1-2010, dice: «La OMS, acusada de recibir sobornos. Sus científicos fueron pagados por farmacéuticas, según “Le Parisien”. La agencia de la ONU niega haber exagerado la alerta de la gripe A».

Ciertamente que ya meses antes, el 30-7-2009, la prestigiosa revista científica internacional *Nature* alertaba acerca del mencionado virólogo Osterhaus, advirtiéndole que éste había avisado sobre el riesgo «de una “inminente” pandemia», mientras su colega Coutinho había indicado, en cambio, que «no hay que tener pánico». A su vez, la revista *Science* del 16-10-2009 señalaba, en relación con tal investigador que: «se ha afirmado que ha acumulado temores a una pandemia para promocionar sus propios intereses en el desarrollo de la vacuna». Confirmando esa sospecha, en ese mismo artículo el, también holandés, epidemiólogo Luc Bonneux, considera a Osterhaus como «parte de una “mafia de la gripe”». Y, asimismo, Miquel Eekelenkamp, igualmente microbiólogo holandés, «llama a Osterhaus “virólogo del pánico”, [que] debe ser permanentemente desterrado de la televisión».

¿Qué dice el acusado?

Osterhaus se defiende alegando que la empresa *ViroClinics* —de la que es propietario en un 9,9%— «no desarrolla vacunas [sino que únicamente] suministra servicios —como ensayos de anticuerpos— para varias compañías que hacen vacunas» (*Science*, 16-10-2009). También ha manifestado: «Me limité a presentar todo un abanico de posibilidades y las autoridades optaron por el peor de los escenarios».

¿Qué opinan las autoridades sanitarias?

El Director Adjunto de la OMS, K. Fukuda, considera «que “la pandemia es una evidencia”, que la gripe A todavía existe y que los riesgos aún no se han conjurado». Asimismo, la Ministra de Sanidad de España, «al ser preguntada en Bruselas si existieron presiones de las compañías farmacéuticas para llevar a cabo la vacunación masiva contra el virus de la gripe A [respondió]: “Rotundamente no”. [...] Además, recordó que en España ha habido unas 700 personas contagiadas internadas en unidades de cuidados intensivos» (*EL MUNDO*, 27-1-2010).

¿Existen publicaciones recientes acerca de vacunas contra la gripe pandémica, en revistas prestigiosas, cuyos autores afirmen no haber sido subvencionados por empresas?

Al igual que hay numerosos artículos en excelentes revistas en que al final de los mismos se reconoce por algún o algunos de los autores haber recibido apoyo económico para la realización de los trabajos, también existen otras publicaciones en que se indica no haber obtenido ningún aporte de empresas comerciales. Entre las de este grupo se hallan algunas como las siguientes:

- *Nature* (27-8-2009): «China está tratando de producir tanta vacuna contra el H1N1 como le sea posible [...]. Datos preliminares relativos a 4.000 personas sugieren que la vacuna es segura y ha provocado respuestas inmunes significativas».
- *Science* (18-9-2009): «El 21 de julio [de 2009], Chen fue la primera persona en China —quizá en el mundo— que recibió la nueva vacuna H1N1. Al día siguiente, China lanzó un ensayo clínico de tres clases de vacunas en 13.000 niños y adultos, utilizando preparados de diez compañías [...]. Una única dosis de vacuna de fragmentos de virus inactivados conteniendo 15 microgramos de hemaglutinina generó una fuerte respuesta de anticuerpos en todos los grupos de edades; el efecto fue más intenso en adolescentes y en adultos que en niños menores de doce años y en adultos de más de sesenta años».

- *British Medical Journal* (6-10-2009): «Las vacunas tradicionales contra la gripe tienen una buena trayectoria acreditada en términos de eficacia y seguridad; por ello, se tardarán años en reemplazarlas, pero las nuevas técnicas y las vacunas que se hallan actualmente en varias etapas de ensayo son necesarias y prometedoras».
- *New England Journal of Medicine* (21-10-2009): En China «una única dosis de 15 microgramos de hemaglutinina, sin adyuvante [de compuestos de] aluminio, induce una respuesta inmune típicamente protectora en la mayoría de las personas de edades entre doce y sesenta años».

¿Y en lo concerniente a los antivirales?

- *British Medical Journal* (13-11-2009): La OMS «recomienda tratamiento precoz para grupos de riesgo con sospecha de padecer gripe, tales como embarazadas, niños menores de dos años» y personas en condiciones de escaso nivel de salud. [...] «Sin embargo, no se recomiendan antivirales para personas sanas que sufran sólo una enfermedad leve».

«LECCIONES DE UNA PANDEMIA.

Es hora de evaluar lo que funcionó y lo que no funcionó en los esfuerzos hechos para hacer frente a la gripe porcina»

- *Nature* [editorial] (14-1-2010): Aunque «la mayoría de los casos han sido leves, los servicios sanitarios estuvieron frecuentemente al límite de su capacidad. Y el hecho de que las vacunas fueran pocas y tardías podría haber sido catastrófico si el virus hubiera sido más letal. [...] Un tremendo desafío fue informar al público acerca de la naturaleza y gravedad de la enfermedad. [...] Esto en EE.UU. se hizo admirablemente. [...] El peligro ahora es que la relativamente suave pandemia del año pasado cree un falso sentimiento de seguridad y complacencia. La realidad es que en el futuro puede no haber tanta suerte, especialmente en países en desarrollo que no tengan acceso a vacunas o a fármacos antivirales».

SITUACIÓN EN ESPAÑA

Esta evaluación general sobre la levedad y duración de la que fue temida amenaza de la primera pandemia del siglo XXI coincide con el informe de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Instituto de Salud Carlos III de nuestro país, según el cual se había reducido, hasta ser casi nula la difusión de la gripe A en España a finales de enero de 2010.

Por tal motivo, habiendo sobrado aquí unos 10 millones de unidades de los 13 que llegaron (aunque inicialmente se habían encargado 37 millones), a mediados de febrero de 2010 el Ministerio español de Sanidad había ofrecido gratuitamente a los países necesitados que lo solicitaran (especialmente los de Iberoamérica) una parte de esos 10 millones, reservando otra parte para alguna eventual campaña futura de vacunación, y devolviendo el resto a los laboratorios fabricantes, según se había concertado previamente (tales centros parece ser que estudian la posibilidad de utilizar quizá dichos remanentes en coordinación o asociación con vacunas futuras).

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a don Javier Escudero (de la Secretaría del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca) su colaboración en algunas búsquedas bibliográficas; y a don Manuel Tirado (de esta Real Academia) haber transcrito las transparencias previstas para la exposición oral del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barry, J. M. (2009) Pandemics: avoiding the mistakes of 1918. *Nature*. 459: 324-325.
2. Butler, D. (2009) How severe will the flu outbreak be? *Nature*. 459: 14-15.
3. Butler, D. (2009) Vaccine decisions loom for new flu strains. *Nature*. 459: 144-145.
4. Cabezas, J. A. (2005) Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. Datos recientes relativos a éstos. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 71: 83-110.

5. Cabezas, J. A. (2006a) Gripe aviar: Situación actual. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72: 301-315.
6. Cabezas, J. A. (2006b) Inhibidores de la neuraminidasa y nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la gripe. *R. Acad. Nac. Farm. Monografía XXI*, 187-239.
7. Cabezas, J. A. (2009a) El virus de la gripe aviar: nuevos aspectos relativos a su patogenicidad y a estrategias para combatirlo. *An. R. Acad. Farm.* 75: 233-254.
8. Cabezas, J. A. (2009b) La nueva gripe A/H1N1 o gripe A/H1N1(2009). *An. R. Acad. Far.* 75: 947-963.
9. Capua, I. (2009) Flu: vaccinate to cut risk of chimaeric virus emerging. *Nature.* 460: 571.
10. Check, B. (2009) The turbulent history of the A(H1N1) virus. *Nature.* 459: 15.
11. Childs, R. A.; Palma, A. S. [...] & Feizi, T. (2009) Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nature Biotechnol.* 27: 797-799.
12. Clarc, T. W.; Pareek, M. [...] & Stephenson, I. (2009) Trial of influenza A (H1N1) 2009 Monovalent MF59-Adjuvanted Vaccine-Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 361: 10.1056.
13. Cohen, J. & Enserink, M. (2009) As Swine Flu Circles Globe, Scientists Grapple With Basic Questions. *Science.* 324: 572-573.
14. Cohen, J. (2009) Out of Mexico? Scientists Ponder Swine Flu's Origins. *Science.* 324: 703-704.
15. Cohen, J. (2009) New Details on Promiscuous Past. *Science.* 324: 1127.
16. Dawood, S.; Seema, J. [...] & Uyeki, T. M. (2009) Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N. Engl. J. Med.* 360: 2605-2615.
17. De Jong, M. (2009) The future of influenza vaccines. *British Med. J.* 339: b4014.
18. Enserink, M. (2009) In Holland, the Public Face of Flu Takes a Hit. *Science.* 326: 350-351.
19. Fraser, C. [...]; López-Gatell, H. [...] & Roth, C. (2009) Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings. *Science.* 324: 1557-1561.
20. García-García, L.; Valdespino-Gómez, J. L. [...] & Hernández-Ávila, M. (2009) Partial protection of seasonal trivalent inactivated vaccine against novel pandemic influenza A/H1N1 2009: case-control study in Mexico City. *British Med. J.* 339: b3928.
21. Garçon, N. & Goldman, M. (2009) Boosting Power Vaccine. *Scien. Am.* Oct.: 52-59.
22. Garten, R. J.; Todd, C. [...] & Cox, N. J. (2009) Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science.* 325: 197-201.
23. Greenberg, M. E.; Lai, M. H. [...] & Bassler, R. L. (2009) Response after One Dose of a Monovalent Influenza A (H1N1) 2009 Vaccine-Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 361: 10.1056.

24. Hannoun, C. (2009) La grippe, ennemie intime. Itinéraire d'un virologue. *Bar-dolles*. Paris, 1-293.
25. Lange, E.; Kaltoff, D. [...] & Vahlenkamp, T. W. (2009) Pathogenesis and transmission of the novel swine origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J. Gen. Virol.* Jul: 10.1099.
26. Layne, S. P.; Monto, A. S. & Taubenberger, J. K. (2009) Pandemic Influenza: An inconvenient Mutation. *Science*. 323: 1560-1561.
27. Libster, R.; Bugna, J. [...] & Polack, F. P. (2010) Pediatric Hospitalizations Associated with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in Argentina. *N. Engl. J. Med.* 362: 45-55.
28. Lowen, A. C. [...], García-Sastre, A., Palese, P. (2006) The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 9988-9992.
29. Maher, B. & Butler, D. (2009) One killer virus, three key questions. *Nature*. 462: 154-157.
30. Maines, T. R. [...] Cox, N. J. [...] & Tumpey, T. M. (2009) Transmission and Pathogenesis of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses in Ferrets and Mice. *Science*. 325: 484-487.
31. Munster, V. J. [...] Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2009) Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) influenza Virus in Ferrets. *Science*. 325: 481-483.
32. Editorial (2010) Lessons for a pandemic. *Nature*. 463: 135-136.
33. Neumann, G.; Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 459: 931-939.
34. Qiu, J. (2009) China boots pandemic surveillance. *Nature*. 460: 1066.
35. Rashford, M. (2009) A/H1N1 flu pandemic. Roche responds. *British Med. J.* 339: b3758.
36. Rijswoud Institute, E. V. (2009) Flu: weighing up conflicting expert information. *Nature*. 468: 571.
37. Shinde, V.; Bridges, C. B. [...] & Finelli, L. (2009) Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005-2009. *N. Engl. J. Med.* 360: 2616-2625.
38. Shun-Shin, M.; Thompson, M. [...] & Mant, D. (2009) Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Med. J.* 339: b3172.
39. Smith, J. D. [...], Peiris, J. S. M. & Rambaut, A. (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 459: 1122-1125.
40. Smith, R. D. [...]; Barnett, T. & Tait, J. (2009) The economy-wide impact of influenza on the UK: a computable general equilibrium modelling experiment. *British Med. J.* 339: b4571.
41. Soares, C. (2009) Pandemic Payoff. *Scien. Am.* Nov.: 11-12.
42. Stone, R. (2009) China First to Vaccinate Against Novel H1N1 Virus. *Science*. 325: 1482-1483.
43. Wenzel, R. P. & Edmont, M. B. (2009) Preparing for 2009 H1N1 Influenza. *N. Engl. J. Med.* 361: 1991-1993.

44. Zarocostas, J. (2009) WHO will start delivering H1N1 vaccine to 100 poorer nations in November. *British Med. J.* 339: b4216.
45. Zarocostas, J. (2009) WHO recommends early antiviral treatments for a risk groups with suspected swine flu. *British Med. J.* 339: b4831.
46. Zhu, F.-C.; Wang, H. [...] & Zheng, J.-S. (2009) A Novel Influenza A (H1N1) Vaccine in Various Age Groups. *N. Engl. J. Med.* (10.1056/NEJMoa0908535).
47. Zuger, A. (2010) A Critical Look at Flu Vaccine Studies. *N. Engl. J. Med.* (18-II).

NOTA ADICIONAL

Después de la redacción del presente trabajo han sido publicados artículos cuyo contenido se refiere a otros importantes aspectos con él relacionados (aunque aún en fase preliminar en lo concerniente a sus posibles aplicaciones terapéuticas), tales como los relativos a la replicación del virus. Entre estas publicaciones destacan las siguientes:

- Köning, R. [...]; García-Sastre, A. & Palese, P. (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 463: 813-817.
- Karlas, A. [...]; Pleissner, K.-P. [...] & Meyer, T. F. (2010) Genome wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 463: 818-822.

Por otro lado, la OMS, el 12 de abril de 2010, ha estimado que unas 17.700 víctimas mortales se han producido por esta gripe por todo el mundo, de las que unas 5.000 corresponden a Europa y unas 340 a España, habiendo aquí pasado por unidades de cuidados intensivos más de un millar de personas y habiendo sido afectadas aproximadamente 1,3 millones.

También se viene reiterando que el riesgo de futuras «olas» —más peligrosas que la primera ahora superada (al igual que ocurrió en pandemias anteriores de gripe)— no es descartable.

* Información de contacto:

Dr. José A. Cabezas Fernández del Campo.
Paseo de Carmelitas, 43, 7.º A.
37002 Salamanca (España).

REVISIÓN

Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homoquirales

Andrés R. Alcántara León, José María Sánchez Montero *

Grupo de Biotransformaciones (BTG).
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Recibido el 14 de diciembre de 2009.

RESUMEN

La exquisita regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores, amén de la buena sostenibilidad inherente a su empleo, permiten la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección. En este trabajo se revisan algunos ejemplos en los cuales las hidrolasas (las enzimas más empleadas dentro del ámbito de las Biotransformaciones) están implicadas como biocatalizadores para la obtención del eutómero (esteroisómero activo, que presenta la actividad terapéutica deseada) bien de diferentes fármacos quirales, o bien de precursores a través de los cuales se puedan sintetizar. Así, se comentarán distintos tipos de biotransformaciones para la obtención de compuestos con diferentes actividades: antivirales, anticancerosos, antihipertensivos, antiinflamatorios, etc, haciendo hincapié en la versatilidad y comodidad del empleo de los biocatalizadores en los pasos sintéticos descritos.

Palabras clave: Biocatalizadores; Hidrolasas; Biotransformaciones; Fármacos.

ABSTRACT

Hydrolases use in the preparation of drugs and homochiral intermediates

The excellent regio and stereoselectivity of biocatalysts, combined with their environmental friendly behaviour, make possible to carry out under biocatalytical conditions many processes which, conducted on strictly classical methodologies, would demand expensive and tedious protection and de-protection steps. In this work we review some examples in which hydrolases (the most useful enzymes in the Biotransformations field) catalyse different reactions for synthesizing only the therapeutically essential stereoisomer of different homochiral building blocks for drugs. Thus, processes leading to antiviral, anticancer, antihypertensive or antiinflammatory drugs, along with many others, are described, remarking the versatility and utility of the biocatalysts in the above-mentioned processes.

Keywords: Biocatalysts; Hydrolases; Biotransformations; Drugs.

1. INTRODUCCIÓN

Los biocatalizadores, tanto en forma de enzimas aisladas como sistemas celulares, están siendo cada día más utilizados en rutas sintéticas que conduzcan a productos de interés industrial (1-8). Aunque sin duda existe un creciente interés en la aplicación de la Biocatálisis a la obtención de productos de bajo valor añadido (9, 10), su utilización está más focalizada hacia el sector del alto valor añadido, especialmente en la industria farmacéutica, puesto que la exquisita regio y estereoselectividad que presentan los biocatalizadores permite la realización de protocolos sintéticos difícilmente alcanzables por las metodologías clásicas, a menos que se lleven a cabo costosos procesos de protección y desprotección. Por otra parte, las condiciones suaves de presión y temperatura que se utilizan en las biotransformaciones evitan la aparición de reacciones colaterales indeseadas (racemizaciones, epimerizaciones o transposiciones) que perjudicarían la economía del proceso. Aún más, las modernas técnicas de modificación genética que permiten la sobreexpresión de enzimas y el aumento de sus propiedades catalíticas (estabilidad y selectividad)

está aumentando de manera considerable el interés en los procesos biocatalizados.

Desde el punto de vista del ámbito de aplicación de la Biocatálisis para la obtención de nuevos fármacos, no cabe duda de que nos enfrentamos a un amplio espectro de utilización, ya que siempre que hablemos de quiralidad, los biocatalizadores desempeñan un papel prominente; en efecto, en el año 2000, un 35% de los sintones utilizados para dicho fin eran quirales, y se espera que este número aumente hasta un 70% en el año 2016 (11). En efecto, después de décadas de una química farmacéutica esencialmente bidimensional, donde la farmacopea estaba plagada de racematos, a comienzos de los años ochenta se produjo un redescubrimiento de la estereoquímica (12). A este hecho contribuyó sobremanera la incorporación al arsenal de reacciones precedentes de nuevas metodologías de obtención de asimetría molecular, entre ellas la Biocatálisis como mencionamos anteriormente, que reavivaron el interés por el estudio estereoquímico del modo de actuación de los fármacos (13). Así, se reconoció que la mayoría de los fármacos eran realmente una mezcla de estereoisómeros, llamados *eutómero* (isómero que presenta la actividad terapéutica deseada) y *distómero* (isómero no activo, que en el mejor de los casos es inactivo y en el peor de ellos puede presentar altos niveles de toxicidad), siguiendo las definiciones de Ariens (14). Esta visión excesivamente simplista ha dado paso a una diferenciación más completa y detallada del papel de cada estereoisómero (12, 15, 16), y en este sentido, hoy día los compuestos que presentan algún centro quiral en su estructura se manufacturan de manera preferente como el eutómero, y las legislaciones más avanzadas [la FDA (Food & Drug Administration) norteamericana, como ejemplo más señero] demandan pruebas concluyentes de que los distómeros carecen de efectos nocivos para la salud. Todos recordamos el tristemente célebre caso de la ftalidomida, por lo que sin duda ha quedado manifiestamente comprobado que el empleo de fármacos homóqu岸ales es esencial para lograr el efecto terapéutico deseado. Además, existen otras ventajas ligadas a su empleo, tales como la reducción de la dosis necesaria, la simplificación del conocimiento de la relación dosis-respuesta y la minimización de la toxicidad. Estos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos han llevado a una gradual preferencia por el empleo de enantiómeros separados tanto a nivel industrial como legislativo. Así,

en términos estadísticos, las ventas mundiales de fármacos quirales en forma del eutémero aislado crecieron en USA a un ritmo de un 13% anual hasta 133 millardos de dólares en 2000 y 147,2 millardos en 2001 (incremento de un 16,7%). En esos años, un 40 y un 36%, respectivamente, de todos los fármacos vendidos fueron enantiómeros simples, frente a un 33% en 1999 (17, 18). Esto implica que el debate entre usar racematos o enantiómeros aislados se está claramente decantando hacia los segundos, y en ese sentido el empleo de procesos biocatalizados tiene mucho aún por ofrecer.

En este sentido, dentro del amplio campo de las Biotransformaciones, sin duda las hidrolasas (enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces principalmente del tipo C-O, C-N, C-C y, en algunos casos, P-O) son las enzimas más ampliamente utilizadas. De hecho, se estima que aproximadamente un 80% de todas las enzimas usadas en procesos industriales pertenecen a esta clase (19). A ello contribuyen de manera especial todas las ventajas inherentes a su utilización, a saber:

- Ausencia de necesidad de cofactores (caros y que deben ser reciclados).
- Buena disponibilidad comercial (un gran número a precios asequibles).
- Capacidad de reconocimiento muy específico de sustratos a veces muy alejados de la estructura de sus sustratos «naturales» [lo que se ha definido recientemente como «promiscuidad catalítica» (20)].
- Posibilidad de utilización en procesos en disolventes no acuosos (especialmente en el caso de las lipasas), lo que permite llevar la biocatálisis en el sentido de la acilación en lugar de la hidrólisis.

Por ello, en este trabajo se pretende llevar a cabo una revisión acerca de los procesos más importantes en los cuales las hidrolasas están implicadas como biocatalizadores para la obtención de moléculas homóquirales a través de las cuales se puedan sintetizar diferentes tipos de fármacos. Para facilitar la lectura del mismo, se ha seguido una ordenación de los procesos basándonos en el criterio de la acción terapéutica del producto obtenido.

2. FÁRMACOS ANTIVIRALES

2.1. Profármacos de lobucavir

El Lobucavir (**5**, Figura 1) es un análogo del nucleósido ciclo-butilguanina, el cual se encuentra bajo desarrollo como un agente antiviral para el tratamiento para el virus del herpes y del virus de la hepatitis B (21). Un profármaco del mismo, en que uno de los dos hidroxilos se une a la valina, **7** se ha considerado interesante para su desarrollo.

La aminoacilación regioselectiva de uno de los dos hidroxilos primarios es difícil de llevar a cabo por procedimientos químicos, aunque sin embargo podría realizarse mediante un proceso enzimático (22). En este sentido, la síntesis del profármaco lobucavir *L*-valina requiere la unión enantioselectiva de uno de los dos grupos hidroxilos del lobucavir con valina, y para ello los procesos enzimáticos fueron desarrollados por aminoacilación de ambos grupos hidroxilo del lobucavir (22). La hidrólisis selectiva del diéster **1** con lipasa M condujo a **3** con un 83% de rendimiento. Cuando el diéster metílico **9** como dihidrocloruro fue hidrolizado con lipasa de *Candida rugosa* se obtuvo **4** con un rendimiento del 87%. Los intermedios finales del profármaco lobucavir, el éster **6**, podrían ser obtenidos por transesterificación de lobucavir usando ChiroCLEC BL (61% de rendimiento) o más selectivamente usando lipasa de *Pseudomonas cepacea* (84% de rendimiento).

2.2. Crixivian (Inhibidor de la proteasa del HIV)

El cis-(*1S,2R*)-1-aminoindan-2-ol (Figura 2, **11**) es un síntón clave para la síntesis de Crixivian (indinavir) **12**, un inhibidor de la proteasa-HIV. Se ha descrito un proceso mediado por una epóxido hidrolasa de *Diplodia gossipina* para la resolución del óxido de indeno racémico **8**. El enantiómero deseado para obtener **11**, el (*1S,2R*)-óxido de indeno **9**, un intermedio quiral para la síntesis del Crixivan, se obtuvo con un rendimiento del 14% y un exceso enantiomérico del 99%, junto con el indanodiol racémico **10** como un producto secundario (23).

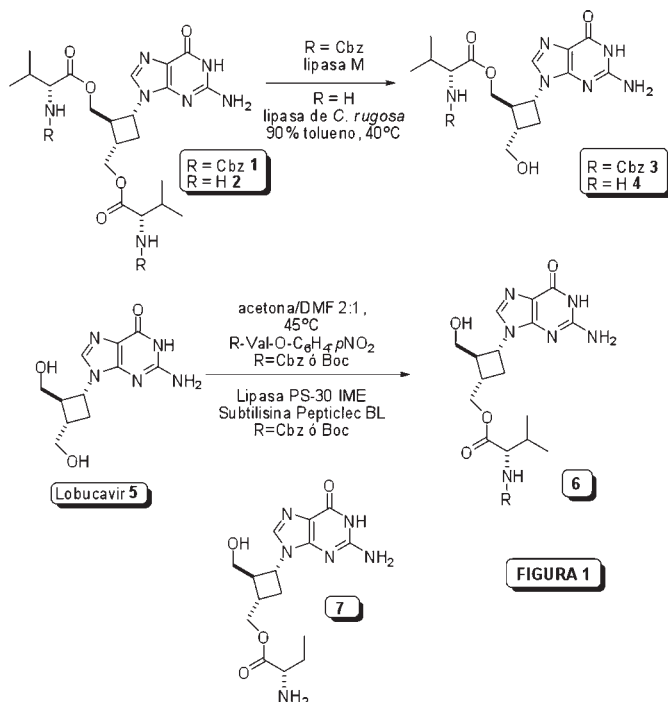


FIGURA 1

Figura 1. Síntesis de los intermedios quirales para el profármaco **7**, mediante hidrólisis enzimática regioselectiva de **1** y **2**, o mediante aminoacilación enzimática regioselectiva del lobucavir **5**.

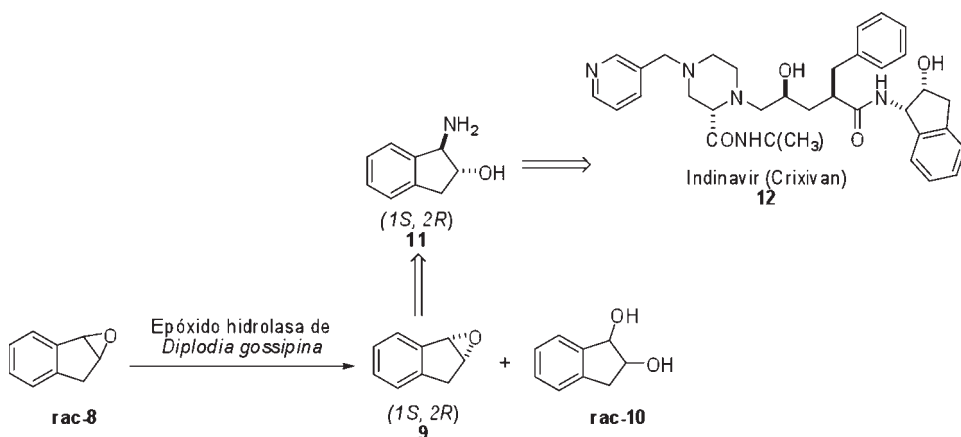


Figura 2. Resolución del óxido de indeno racémico **8** para la obtención de los intermedios homocirales **9** y **11** necesarios para la síntesis del indinavir **12**.

3. FÁRMACOS ANTICÁNCEROSOS

3.1. Cadena lateral del taxol (Paclitaxel)

Entre los agentes antimitosis, el paclitaxel (Taxol) (**16**, Figura 3) un terpeno policíclico complejo, exhibe un único modo de acción sobre las proteínas microtubulares responsables de la formación de el huso mitótico durante la división celular, pues inhibe el proceso de despolimerización de la microtubulina (24). El Paclitaxel se ha utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer entre los que podemos citar el cáncer de ovarios, y metástasis de cáncer de mama con resultados prometedores. El Paclitaxel fue originalmente aislado de la corteza del tejo *Taxus brevifolia* y también se ha encontrado en otras variedades de tejo. El principal inconveniente es que el rendimiento es muy bajo (0,07%). Se ha estimado que son necesarias unas 20.000 libras de corteza de tejo (equivalente a 3.000 árboles) para producir 1 kg de Paclitaxel (25). El desarrollo de un proceso semisintético para la producción de Paclitaxel a partir de, por un lado, bacatina III **14** (Paclitaxel sin cadena lateral en C-13) o 10-desacetilbacatina III **15** (10-DAB, paclitaxel sin cadena lateral en C-13 y sin el acetato del C-10), y por el otro de la estructura lactámica **13** (precursora de la cadena lateral en C-13) es una muy interesante propuesta. En efecto, tanto diferentes taxanos (estructuras derivadas de **14** ó **15**), como la bacatina III o la 10-DAB pueden obtenerse a partir de agujas, brotes y cultivos jóvenes de tejo (26). Es decir, la producción de paclitaxel por un proceso semisintético podría eliminar la tala de árboles de tejo.

Así pues, lograr la correcta estereoquímica de la cadena lateral en C-13 es de crucial importancia. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidina **17** (Figura 4) al correspondiente alcohol **19** y el *R*-acetato **18** (27) usando una lipasa PS-30 de *Pseudomonas cepacea* (Amano) y BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida de la fermentación de *Pseudomonas sp.* SC 13856). El rendimiento de reacción obtenido para el (*R*)-acetato **18** fue superior al 48% (máximo teórico del 50% para una resolución cinética) con un exceso enantiomérico superior al 99,5%.

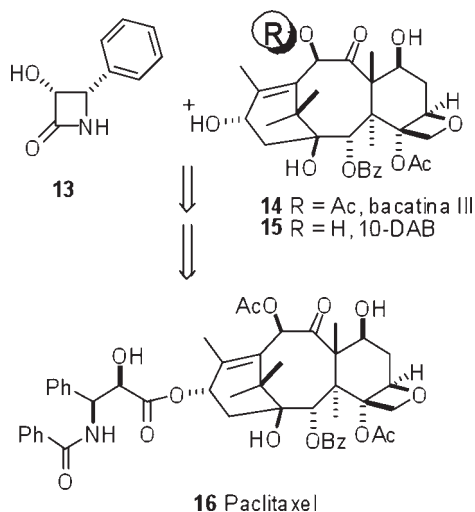


Figura 3. Estructuras del paclitaxel **16** y de los intermedios de semisíntesis bacatina III (**14**) y 10-DAB (10-desacetilbacatina, **15**).

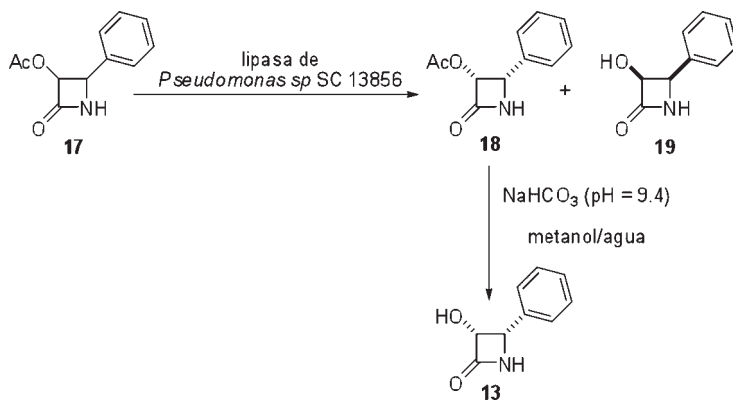


Figura 4. Hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidinona **17**, y posterior hidrólisis química para la obtención de **13**.

La lipasa BMS y la lipasa PS-30 fueron inmovilizadas sobre polipropileno Accurel (PP), y las lipasas inmovilizadas se pueden reutilizar (diez ciclos) sin pérdida de actividad enzimática, productividad o enantiopureza del producto **18** en el proceso de resolución. El proceso enzimático fue escalado hasta 250 L (2,5 kg sustrato) usando

lipasa BMS y lipasa PS-30 respectivamente. De cada *batch* de reacción, se aisló el *R*-acetato **18** con un 45% de rendimiento y 99,5% de e.e. Mediante una suave hidrólisis en medio básico, el *R*-acetato se transformó químicamente al *R*-alcohol **13**, síntón que al ser acoplado a la bacatina III **14**, tras una protección y desprotección, permite preparar paclitaxel por un proceso semisintético (26).

3.2. Taxano activo por vía oral: Preparación enzimática de (3*R*-cis)-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-2-azetidiona

Debido a la pobre solubilidad en agua del paclitaxel, varios grupos están desarrollando análogos solubles en agua (28-30). El producto **24** (Figura 5) es un derivado de taxano soluble en agua, que cuando se administra por vía oral, resulta tan efectivo como el paclitaxel en cinco modelos tumorales [pulmón M109 y cáncer de mamas en ratón, cáncer de ovario humano (expresado en ratas y ratones), y en cáncer de colon HCT/pK] (29).

El intermedio quiral (3*R*-cis)-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **21** fue preparado para la semisíntesis del nuevo taxano **24**. La hidrólisis enzimática enantioselectiva de *rac*-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **20** al correspondiente (*S*)-alcohol no deseado **22** y el (*R*)-acetato buscado **21** fue realizada utilizando lipasa PS-30 (Amano) o BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida a partir de la fermentación de *Pseudomonas* sp. SC 13856). Se obtuvo un rendimiento de reacción mayor del 48% (de nuevo un 50% es el máximo teórico) con un exceso enantiomérico mayor del 99% para el (*R*)-acetato.

Por otra parte, la semisíntesis del taxano **32** también requiere disponer de 4,10-didesacetilbacatina III **25** (Figura 6) como material de partida para la síntesis del derivado metoxycarbonilado en C4 de la 10-didesacetilbacatina **26**. Para la deacetilación de la 10-DAB **15** a **25** se empleó una hidrólisis enzimática regioselectiva utilizando como catalizador células de *Rhodococcus* sp SC 162949 aislada de soja empleando técnicas de enriquecimiento de los cultivos microbianos (30).

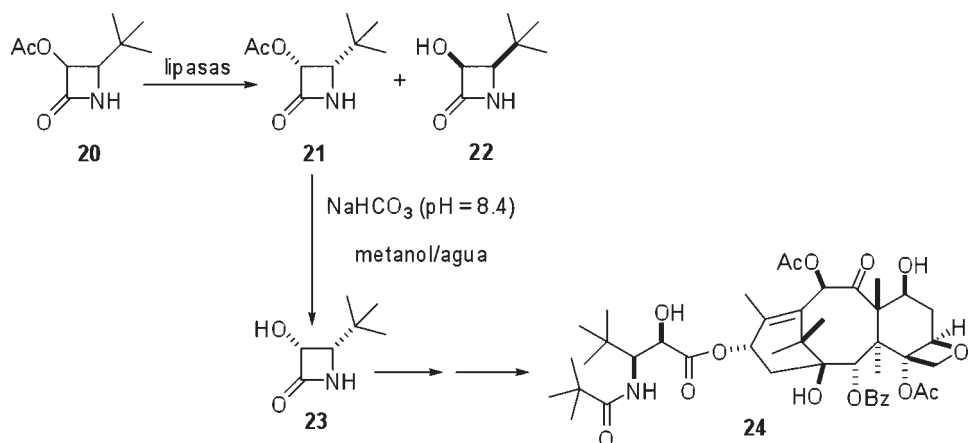


Figura 5. Hidrólisis enantioselectiva del rac-3-acetiloxi-4-(1,1-dimetiletil)-azetidiona **20**, y posterior hidrólisis química para la obtención de **23**.

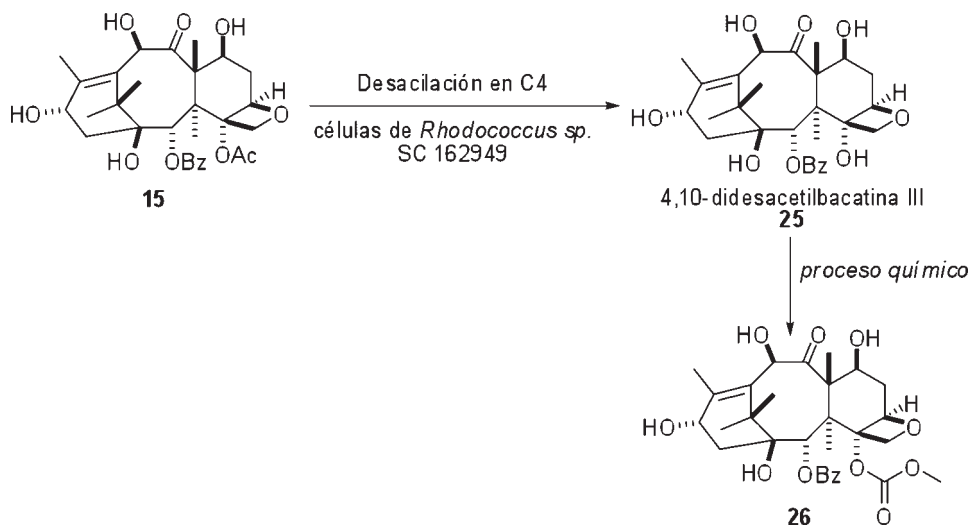


Figura 6. Desacilación enzimática de la 10-DAB **15**.

3.3. Desoxiespergualina. Acetilación enzimática enantioselectiva de rac-7-[N,N'-bis(benziloxycarbonil)-N-(guanidinoheptanoil)]- α -hidroxiglicina

La espergualina es un antibiótico antitumoral que fue descubierto en el filtrado del caldo de cultivo de una cepa bacteriana siendo su estructura la (15*S*)-1-amino-10-guanidino-11,15-dihidroxi-4,9,12-triazanadecano-10,13-diona (31). La síntesis total vino acompañada de la condensación catalizada por el ácido del 11-amino-1,1-dihidroxi-3,8-diazaundecano-2-ona con (*S*)-7-guanidino-3-hidroxiheptanamida seguido por la separación de la mezcla de epímeros. La actividad antibacteriana o antitumoral de la espergualina racémica demostró ser la mitad de la espergualina natural (32), indicando pues la importancia de la configuración absoluta en C11 para la actividad antitumoral.

La acetilación enantioselectiva del 7-[N, N'-bis(benziloxycarbonil)-N-(guanidinoheptanoil)]- α -hidroxiglicina racémica (**27**, Figura 7) catalizada por la lipasa AK condujo al correspondiente (*S*)-acetato **28** y al (*R*)-alcohol **29** (33). Por su parte, el (*S*)-acetato **28** es un intermedio clave en la síntesis química de la (*S*)-15-desoxiespergualina **30**, un agente inmunosupresor y antibiótico antitumoral (34). La reacción se llevó a cabo en metil-isobutil-cetona usando una lipasa de *Pseudomonas sp.* (lipasa AK) con acetato de vinilo como agente acilante. Se obtuvo un rendimiento del 48% con un exceso enantiomérico del 98% para el (*S*)-acetato **42**. El alcohol (*R*)-**43** se obtuvo con un 41% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 94%.

3.4. Acilación de Purina

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

Partiendo de la estructura **31**, y usando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B y acetato de vinilo como donador de acilo se obtuvo el 5'-monoacetato **32** con un 99% de conversión. El compuesto obtenido es más soluble por lo que aumenta su biodisponibilidad. Esta transformación es prácticamente imposible de realizar

por una acetilación química convencional debido a la conocida preferencia por la N-acilación. La regioselectividad del proceso es remarcablemente alta, ya que se obtiene menos del 0,1% del 3'-acetato y aproximadamente un 0,3% del 3',5'-diacetato (35).

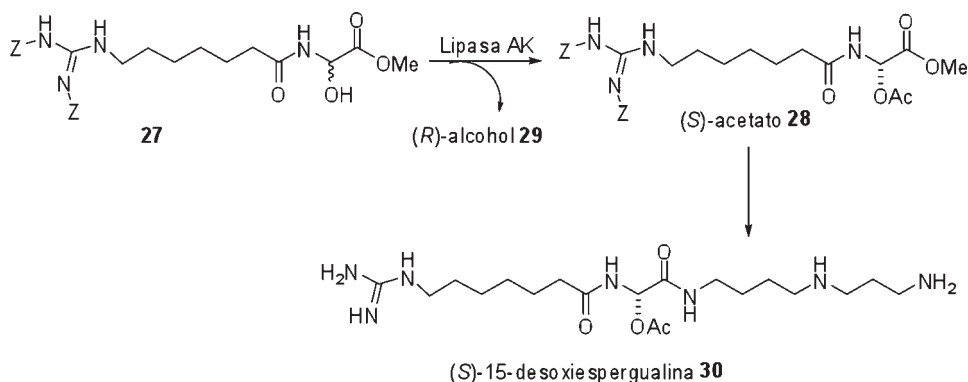


Figura 7. Síntesis de los intermedios quirales para la obtención de la (S)-15-desoxiespergualina **30**: acilación enantioselectiva del rac-27 para la obtención del acetato homóquiral **28**.



Figura 8. Acilación regioselectiva de purinas.

4. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

4.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

4.1.1. *Captopril: Preparación enzimática del ácido (S)-3-acetiltio-2-metil propanoico*

El captopril corresponde químicamente a la estructura de 1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina (**36**, Figura 9). Se usa como un agente antihipertensivo mediante la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona (36, 37). El captopril previene la conversión de angiotensina I a angiotensina II (AII) por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La potencia del captopril como un inhibidor del ACE depende críticamente de la configuración del resto mercaptoalcanoilo; así, el compuesto con la configuración S es cien veces más activo que el correspondiente R-isómero (38). El resto requerido ácido (2S) 3-mercapto-2-metilpropiónico ha sido obtenido de una fuente microbiana a partir del ácido (2R)-3-hidroxi-metilpropiónico, que a su vez es obtenido por hidroxilación del ácido isobutírico (29).

La síntesis de la (S)-cadena lateral del captopril fue realizada por hidrólisis enantioselectiva catalizada por lipasa del enlace tioéster del ácido 3-acetiltio-2-metil propanóico racémico **33** para obtener el compuesto (S)-**34** (40). Entre las distintas lipasas evaluadas, la lipasa de *Rhizopus oryzae* ATCC 24563 y la lipasa PS-30 de *P. cepacea* en medios orgánicos (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano o tolueno) catalizó la hidrólisis del enlace tioéster del enantiómero no deseado del producto racémico **33** para dar el producto S-**34** deseado, y también ácido (R)-3-mercapto-2-metil propanóico **35** y ácido acético. De esta forma, se obtuvieron rendimientos de reacción superiores al 24% con un e.e. superior al 95% para el compuesto (S)-**34** usando cada lipasa.

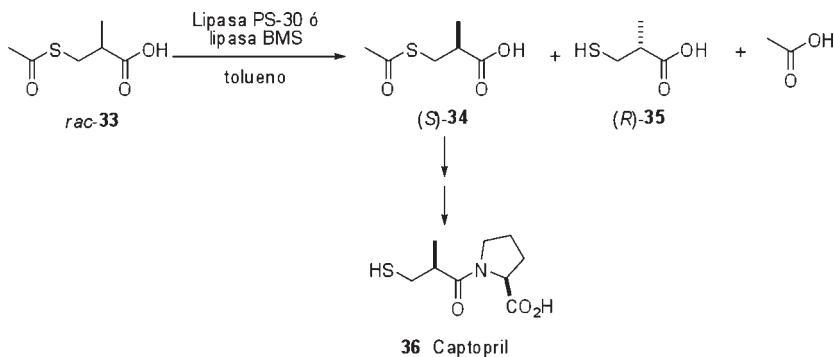


Figura 9. Síntesis enzimática de los sintones para la obtención del captopril **36**: hidrólisis enantioselectiva del ácido rac-3-acetiltio-2-metilpropanoico **33**.

4.1.2. Zofenopril: Preparación enzimática del ácido (S)-3-benzoitio-2-metilpropanoico

En un proceso alternativo para preparar tanto la cadena lateral del captopril **36** y del zofenopril **40**, se ha descrito una esterificación enantioselectiva del ácido 3-benzoitio-2-metilpropanoico racémico (**37**, Figura 10) catalizado por lipasas en un disolvente orgánico, para dar el *R*- (+) éster metílico **39**, dejando así libre el síntón deseado, el ácido *S* -**38** (41).

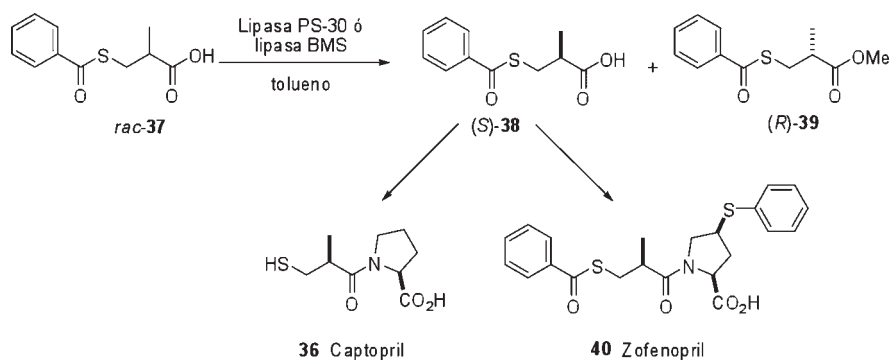


Figura 10. Síntesis enzimática de los sintones para la obtención del captopril **36** y del zofenopril **40**: esterificación enantioselectiva del ácido rac-3-bencitio-2-metilpropanoico **37**.

Usando lipasa PS-30 con tolueno como disolvente y metanol como nucleófilo, se obtuvo el producto deseado (S)-**38** con un 37% de rendimiento y 97% de exceso enantiomérico. Tanto la cantidad de agua como la concentración de metanol añadida a la mezcla de reacción fueron parámetros críticos; así, el agua fue añadida a una concentración de 0,1% en la mezcla de reacción. Cantidades superiores al 1% de agua conducen a la agregación de la enzima en el disolvente orgánico, con una disminución en la tasa de reacción debido a limitaciones de transferencia de masa. La tasa de esterificación disminuyó cuando la relación metanol/sustrato se incrementó de 1:1 a 4:1. Por otra parte, altas concentraciones de metanol inhibieron la esterificación debido probablemente al atrapamiento del agua esencial de la enzima. La lipasa nativa PS-30 fue inmovilizada sobre polipropileno Accurel (PP) por absorción con una eficiencia del 98,5%. La lipasa inmovilizada catalizó eficientemente la reacción de esterificación dando 45% de rendimiento con un 97,5% de exceso enantiomérico del producto (S)-**38**, permitiendo eficazmente un rendimiento y exceso enantiomérico similar del producto durante 23 ciclos de reutilización sin pérdida apreciable de actividad y productividad. El (S)-**38** es un intermedio clave para la síntesis de captopril (42) o zefenopril (43).

4.1.3. *Monopril: Preparación enzimática de monoacetatos de (S)-2-ciclohexil y de (S)-2-fenil-1,3-propanodiol*

El monoacetato de (S)-2-ciclohexil-1,3-propanodiol **43** y (S)-2-fenil-1,3-propanodiol **44** son intermedios quirales para la síntesis quimioenzimática de Monopril (**45**, Figura 11), un fármaco antihipertensivo que actúa como inhibidor sobre la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La hidrólisis asimétrica del diacetato de 2-ciclohexil-1,3-propanodiol **41** y el diacetato de 2-fenil-1,3-propanodiol **42** a los correspondientes (S)-monoacetatos **43** y **44** se llevó a cabo con lipasa pancreática porcina (PPL) y lipasa de *Chromobacterium viscosum* (443). Así, aplicando un sistema bifásico que contenía un 10% de tolueno, se obtuvieron rendimientos de reacción del 65% con un 99% de e.e. para el producto (S)-**43**, usando ambas enzimas. Por su parte, el (S)-**44** fue obtenido con un rendimiento del 90% con un e.e. del 99,8% utilizando lipasa de *Chromobacterium viscosum* en condiciones similares.

4.2. Inhibidores de la endopeptidasa neutra

4.2.1. Preparación enzimática del ácido (S)- α -[(acetiltio)metil]benceno propanoico

El ácido (S)- α -[(acetiltio)metil]fenilpropanoico (**47**, Figura 12) es un intermedio quiral clave para la síntesis del inhibidor de la endopeptidasa neutra (NEP) **49** (45). La lipasa PS-30 catalizó la hidrólisis enantioselectiva del enlace tioéster del *rac*-**47** en disolvente orgánico para dar el ácido (R)- α -[(acetiltio)metil]fenilpropanoico **48** y el sin-tón deseado (S)-**47**, el cual se obtuvo con un rendimiento del 40% con un exceso enantiomérico del 98% (40).

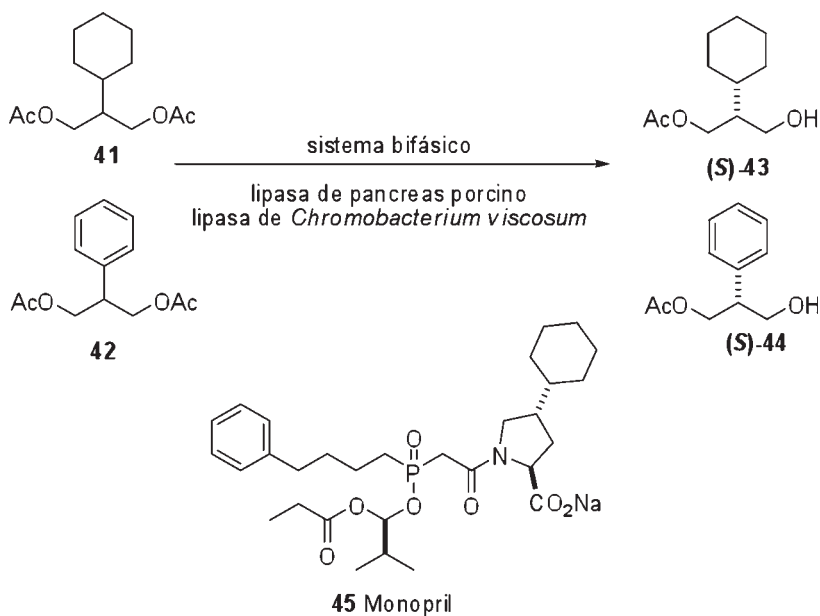


Figura 11. Preparación de los sintones quirales para la obtención del Monopril: hidrólisis enzimática asimétrica de los diacetatos **41** y **42** a los correspondientes monoacetatos (S)-**43** y (S)-**44**.

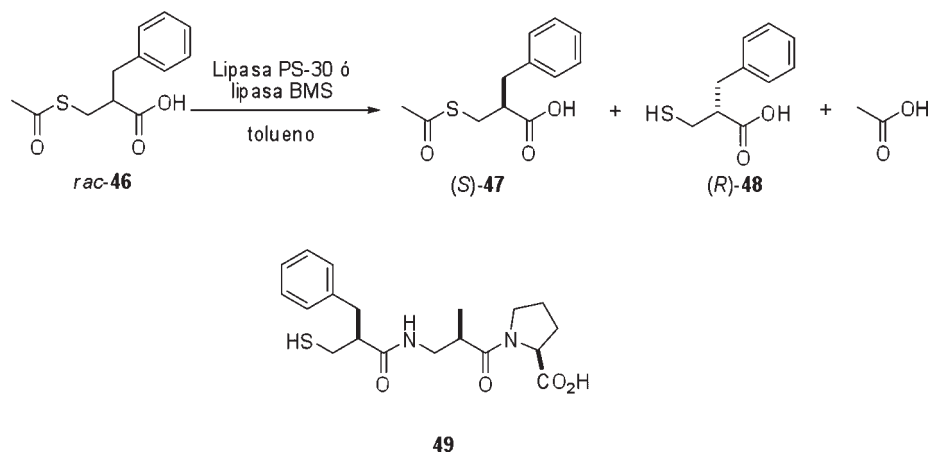


Figura 12. Preparación del síntón quiral para la obtención de **49** a través de la hidrólisis enzimática de **46**.

4.3. Bloqueantes de los canales de calcio

4.3.1. Diltiazem

Los fármacos bloqueantes de los canales de calcio forman un grupo diverso desde el punto de vista químico y farmacológico. Desde el punto de vista químico, el diltiazem es una benzotiazepina que se usa para tratar la hipertensión y para controlar el dolor en el tórax (angina). Funciona al relajar los vasos sanguíneos para que el corazón no tenga que bombear con dificultad. También aumenta el suministro de sangre y de oxígeno al corazón. Las compañías DSM-Andeno y Tanabe Pharmaceutical han comercializado una lipasa que cataliza la resolución del éster metílico correspondiente del ácido (+)-(2*S*,3*R*)-*trans*-3-(4-metoxifenil)-glicídico (MPGM) **(2*S*,3*R*)-50**, Figura 13, un precursor clave para el diltiazem **53** (46-49). El proceso DSM-Andeno usa una lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML), mientras que el proceso Tanabe utiliza una lipasa secretada por *Serratia marcescens* Sr41 8000. En ambos, casos la lipasa cataliza la hidrólisis del racémico **rac-50** para «limpiar» el enantiómero deseado **(2*S*,3*R*)-50** del ácido producto de la hidrólisis enzimática **(2*R*,3*S*)-51**, el cual se descompone espontáneamente al aldehído **54**.

En el proceso Tanabe, en un reactor de membrana se combina la hidrólisis, separación y cristalización del **(2S,3R)-50**. En este sentido, el tolueno disuelve el sustrato racémico en el cristizador y lo lleva hasta la membrana que contiene la lipasa inmovilizada. La lipasa cataliza la hidrólisis del enantiómero no deseado originando el ácido **(2R,3S)-51**, el cual pasa a través de la membrana en la fase acuosa. La espontánea descarboxilación del ácido da el correspondiente aldehído que reacciona con el bisulfito en la fase acuosa. En ausencia de bisulfito, este aldehído desactivaría la lipasa. El enantiómero deseado **(2S,3R)-50** permanece en la fase tolueno y se lleva hasta el cristizador. La actividad de la lipasa baja significativamente después de ocho ciclos y la membrana puede ser recargada con lipasa adicional. Con este proceso, el rendimiento del producto cristalizado **(2S,3R)-50** fue mayor del 43% con el 100% de pureza enantiomérica.

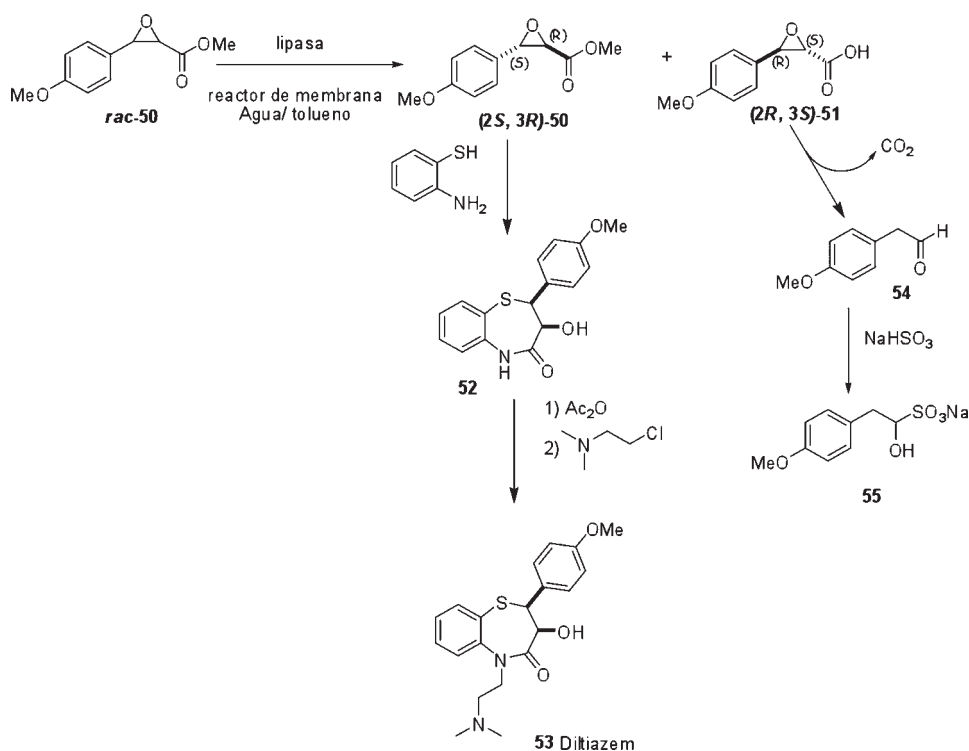


Figura 13. Proceso Tanabe para la preparación del sintón quiral **(2S, 3R)-50** para la obtención del diltiazem **53**.

5. FÁRMACOS ANTICOLESTEROLÉMICOS

5.1. Preparación enzimática de (*R*) y (*S*) 3-hidroxiбутirato de etilo

La producción de (*R*) y (*S*) 3-hidroxiбутirato de etilo (HEB), molécula clave para la obtención de fármacos que inhiben la HMG CoA reductasa, se ha desarrollado y escalado hasta la escala de kilogramos mediante un eficiente proceso enzimático en dos pasos, representado en la Figura 14. Ambos enantiómeros fueron obtenidos al 99% de pureza química y 96% de e.e. con un rendimiento del proceso completo del 73%. En la primera reacción se realizaba la acetilación del HEB racémico **56** con acetato de vinilo para la producción de (*S*)-HEB (**S**)-**56**. En la segunda reacción, el (*R*)-3-acetoxibutirato de etilo (AEB) obtenido en el primer paso por la reacción enzimática fue sometido a una etanolisis (*R*)-HEB ópticamente puro (**R**)-**56**. En ambas etapas se empleó, con alta productividad y selectividad, la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B (CALB).

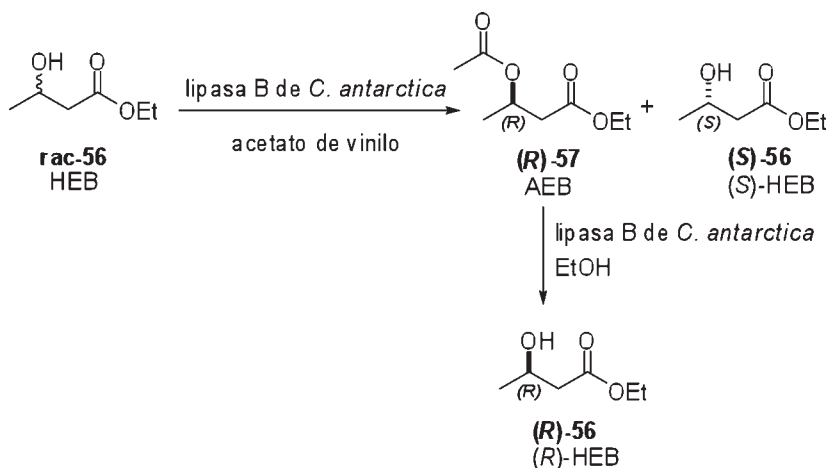


Figura 14. Preparación en dos pasos de los dos enantiómeros del HEB.

El tipo del éster del ácido butírico empleado influyó la enantioselectividad de la enzima. Esto es, el aumento de la cadena alquílica de etilo a octilo resultó en una disminución de la enantiopureza, mientras que usando grupos voluminosos como bencilo o *t*-butilo, se

mejoró la enantioselectividad de la enzima. Los reactivos se hicieron recircular sobre la enzima inmovilizada en un reactor en columna hasta que se obtuvo la máxima conversión. Los productos deseados fueron separados de la mezcla de reacción en cada una de las dos etapas por destilación fraccionada. La principales características del proceso son la exclusión del disolvente y el uso de la misma enzima para los pasos de acetilación y alcoholisis para preparar kilogramos de (*S*)-HEB) y (*R*)-HEB (50).

5.2. Preparación enzimática de (3*R*, 5*S*)-3,5-dihidroxi-6-(feniloxi)hexanoato de etilo

La (3*R*, 5*R*)-[4-[4a,6b(E)]]-6-[4,4-bis[4-fluorofenil] 3 - (1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)-1,3-butadienil] tetrahidro-4-hidroxi-2*H*-piren-2-ona (**59**, Figura 15) es un nuevo y potencial fármaco anticolesterolémico que actúa por inhibición de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa (51). Se ha descrito una ruta biocatalizada para la obtención de sintones homoquirales del tipo 1,3-diol a través de procesos catalizados por alcohol deshidrogenasas en células de *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13876 con altas conversiones (52).

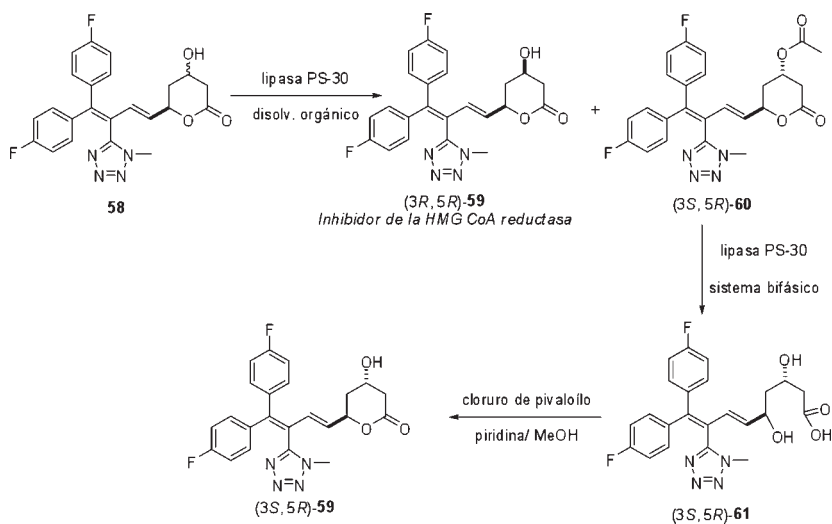


Figura 15. Síntesis del anticolesterolémico (3*R*, 5*R*)-**59**: acetilación enzimática diastereoselectiva de **58**.

Usando un proceso de acetilación enzimática diastereoselectiva, el **(3R, 5R)-59** se preparó a partir de la mezcla diastereoisomérica **58** (543). La lipasa PS-30 y la lipasa BMS (producida por fermentación de cepas de *Pseudomonas* SC 13856) catalizaron eficientemente la acetilación de **58** (4g/L) para dar el (3S, 5R) acetato **60** y el compuesto buscado (3R, 5R)-alcohol **59**. Se logró un rendimiento máximo del 49% y un exceso enantiomérico del 98,5% para el (3R, 5R)-alcohol **59** cuando se utilizó tolueno en presencia de acetato de isopropenilo como donador de acilo. En metil isobutil cetona, a una concentración de sustrato de 50 g/L, se obtuvo un rendimiento máximo de reacción de un 46% y un exceso enantiomérico del 96% para el producto **59**.

El proceso enzimático fue escalado (proceso de la compañía Bristol-Myers Squibb) hasta los 640 L, usando lipasa inmovilizada PS-30 en un reactor tipo *batch* (tanque agitado discontinuo). Así, de la mezcla de reacción se aisló el (3R, 5R)-alcohol **59** con un rendimiento total del 35% y 98,5% de exceso enantiomérico, con una pureza del 99,5%. Asimismo, el (3S, 5R)-acetato **60** producido por este proceso fue enzimáticamente hidrolizado por la lipasa PS-30 en un sistema bifásico para preparar el correspondiente enantiómero (3S, 5R)-**59**.

5.3. Preparación enzimática del éster dietílico del ácido S-[1-(acetoxil)-4-(3-fenil)butil] fosfónico

La escualeno sintasa es la primera enzima específica en la biosíntesis del colesterol, y cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) para formar escualeno. Esta enzima se ha implicado en la transformación de FPP a pirofosfato de preescualeno (PPP). En este sentido, indicaremos que los análogos de FPP son una clase importante de inhibidores de la escualeno sintasa (54). No obstante esta clase de compuestos carecen de especificidad hacia esta enzima, por lo que forman un grupo de potenciales inhibidores de otras transferasas dependientes de FPP, tales como la geranio-geranil pirofosfato sintasa. Para incrementar la especificidad de la enzima, se han sintetizado análogos de PPP y otros inhibidores basados en el mecanismo de la enzima como el compuesto **62** (Figura 16) (55). En este sentido, el éster dietílico del

ácido S-[1-(acetoxil)-4-(3-fenil)butil] fosfónico **62** es un intermedio quiral clave requerido para la síntesis química total de **65**. La acetilación enantioselectiva del éster dietílico racémico del ácido [1-(hidroxi)-4-(3-fenil)butil] fosfónico **62** se ha llevado a cabo con lipasa de *G. candidum* en tolueno usando acetato de isopropenilo como donador de acilo (56). Se obtuvo un rendimiento del 38% y un exceso enantiomérico del 95% para la obtención del compuesto **64**.

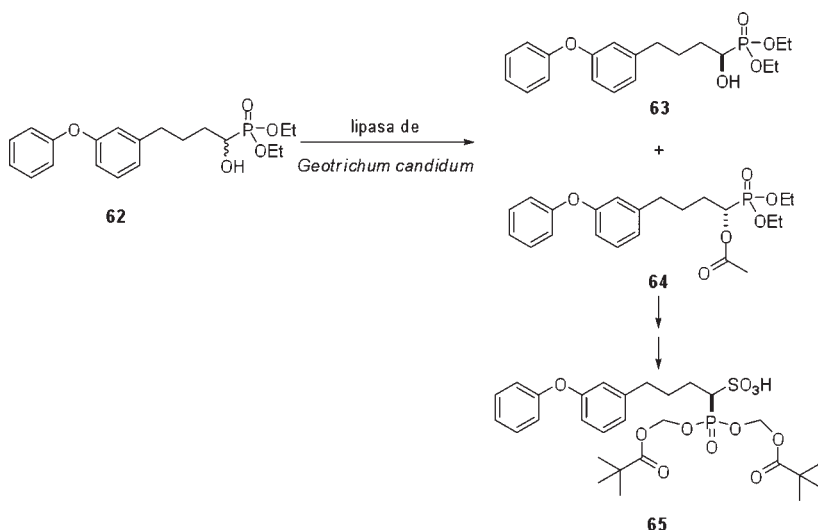


Figura 16. Acilación enzimática de un síntón quiral para la síntesis del inhibidor de la escualeno sintasa **65**: acilación enantioselectiva del racémico **62** para obtener el (S)-acetato **64**.

6. ANTAGONISTAS DEL TROMBOXANO A2

6.1. Preparación enzimática de lactol [3aS-(3a α ,4 α ,7 α , 7a α)]-4,7-epoxibencenofuran-1-(3H)-ol

El tromboxano A2 (TxA2) es una potente sustancia vasoconstrictora producida en el metabolismo del ácido araquidónico en las plaquetas de la sangre y otros tejidos. La potente actividad antiagregatoria y vasodilatadora del TxA2 juega un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis, y contribuye a la patogénesis de una gran variedad de desórdenes vasculares.

Estudios para limitar el efecto del TxA2 se han basado en inhibir su síntesis o bloquear su acción en los lugares de unión al receptor por medio de antagonistas (57, 58). El lactol [3aS-(3 α ,4 α ,7 α , 7 α)]-4,7-epoxibencenofuran-1-(3*H*)-ol **67** (Figura 17) o la correspondiente lactona quiral **68** son los intermedios clave en la síntesis total del ácido [1*S*-[1, 2''(Z), 3'', 4-[[7-3[[[1-oxoheptil)-amino]acetil]metil]-7-oxabicyclo-[2,2,1] hept-2-il]-5-heptanóico **69**, un nuevo agente cardiovascular de uso potencial en el tratamiento de enfermedades trombóticas (59).

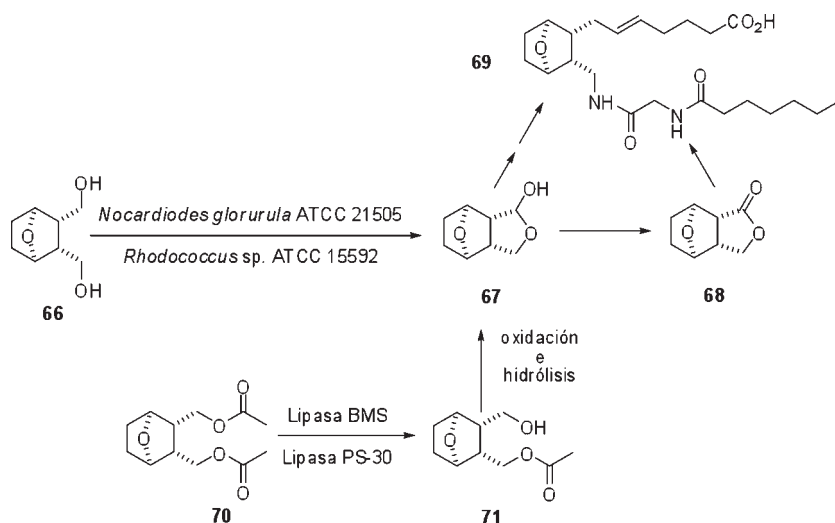


Figura 17. Síntesis de los sintones quirales para la obtención del compuesto **69**, antagonista del tromboxano A2.

La oxidación enantioselectiva del (exo,exo)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptano-2,3-dimetanol **66** al correspondiente (*S*)-lactol **62** y (*S*)-lactona **63** se ha llevado a cabo utilizando células de *Nocardia globerula* ATCC 21505 y *Rhodococcus* sp. ATCC15592 (60). La lactona **68** fue obtenida con un rendimiento máximo del 70% y un e.e. del 96%, respectivamente, usando una suspensión de células de *Nocardia globerula* ATCC 21505. Para el lactol **67** y la lactona **68** se obtuvieron unos rendimientos de reacción completos del 46% (lactol y lactona combinado) y 96,7% y 98,4% de e.e., respectivamente, usando suspensiones de células de *Rhodococcus* sp ATCC15592.

Por otra parte, la hidrólisis enantioselectiva del diacetato (exo,exo)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptano-2,3-dimetanol **70** al correspondiente éster S-monoacetato **71** se ha realizado utilizando lipasa PS-30 de *P. cepacea* (61). Se obtuvo un rendimiento máximo de reacción del 75% y un e.e. mayor del 99% cuando la reacción se realizó en un sistema bifásico empleando un 10% de tolueno. La lipasa PS-30 fue inmovilizada sobre polipropileno Accurel (PP) y la enzima inmovilizada fue reutilizada durante cinco ciclos sin pérdida de actividad, productividad o e.e. del producto **71**. El proceso de reacción fue escalado hasta los 80 L (400 g de sustrato) y el producto **71** fue aislado con un rendimiento de 80% con un 99,3% de e.e. El S-monoacetato fue oxidado a su correspondiente aldehído, que fue hidrolizado al (S)-lactol **67** usado posteriormente en la síntesis quimio-enzimática del antagonista del tromboxano A2 **69**.

7. ACTIVADORES DE LA APERTURA DE LOS CANALES DE POTASIO

7.1. Preparación de epóxidos quirales y dioles por oxigenación microbiana

Es bien sabido que los canales de potasio juegan un importante papel en la excitabilidad neuronal y un papel crítico en la función eléctrica básica y mecánica de una amplia variedad de tejidos, incluyendo el tejido liso y el músculo cardíaco (62, 63). En este sentido, se ha desarrollado una nueva clase de compuestos altamente específicos que abren o bloquean los canales de K (64). Por lo que se refiere al primer tipo, se han sintetizado activadores de la apertura de los canales de K basados en estructuras del tipo *trans*-4-amino-3,4-dihidro-2,3-dimetil-2*H*-1-benzopirano-3-oles monosustituídos (**75**, Figura 18) (65, 66). El epóxido quiral **73** y el diol **74** son potenciales intermedios para la síntesis de **75**, a través de la oxigenación microbiana enantioselectiva del 6-ciano-2,2-dimetil-2*H*-1-benzopirano **72** al correspondiente epóxido quiral **73** y el diol **74** (67). Por tanto, nos encontramos con unas actividades monooxigenasas y epóxido-hidrolasas presentes en las células de *M. ramaniana* SC 13840 y *Corynebacterium* sp. SC 13876, que condujeron a rendimientos máximos de 67,5 y 32% y excesos enantioméricos del 96 y 89%, respectivamente,

para el (+) *trans* diol **74**. Las células de *Corynebacterium* sp. SC 13876 también produjeron el epóxido quiral **73** con un rendimiento máximo del 17% y un 88% de e.e.

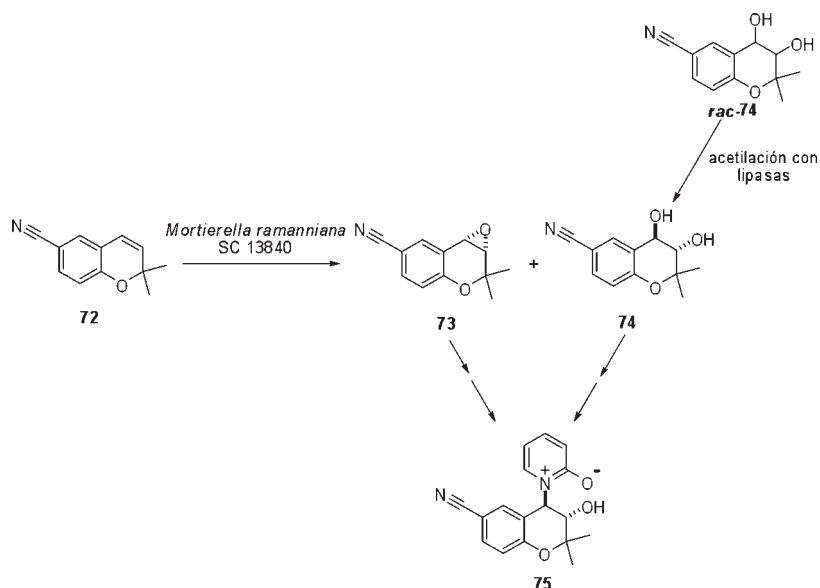


Figura 18. Preparación de los sintones quirales para la obtención del compuesto **75**, activante de los canales de potasio.

Un proceso en una sola etapa (fermentación/epoxidación) para la biotransformación de **72** fue desarrollado usando *M. ramaniana* SC 13840. En un fermentador de 25 L, el (+) *trans* diol **74** fue obtenido con un rendimiento del 61% y un e.e. del 92,5%. Por otra parte, en un proceso en dos etapas usando una suspensión de células (10% p/v, células húmedas) de *M. ramaniana* SC 13840, el (+) *trans* diol **74** fue obtenido con un rendimiento máximo del 76% con un e.e. del 96% cuando la reacción fue realizada en un fermentador de 5L Bioflo. Se añadió glucosa para regenerar el NADH requerido para esta reacción, y de la mezcla de reacción, el (+) *trans* diol **74** fue aislado con un rendimiento completo de 65% y 97% de e.e. (98% de pureza química).

En otra aproximación biocatalizada por hidrolasas, para llevar a cabo la resolución enzimática, el (+) *trans* diol **74** fue preparado por

acetilación enantioselectiva del diol racémico **rac-74** con las lipasas de *C. rugosa* y *P. cepacea* (68). Ambas enzimas catalizaron la acetilación del enantiómero no deseado del diol racémico para dar el producto monoacetilado y el (+) *trans* diol **74**. Un rendimiento de reacción del 40% y un e.e. mayor del 90% fueron descritos con ambas lipasas.

8. RECEPTORES AGONISTAS DE MELATONINA

8.1. Hidrólisis enzimática enantioselectiva de 1-[2',3'-dihidro benzo[b]furan-4'-il]-1,2-oxirano

Las epóxido hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis enantioselectiva de un epóxido al correspondiente diol enantioméricamente enriquecido, quedando el enantiómero del epóxido que no reacciona enriquecido en una configuración contraria a la del diol (69, 70). El (*S*)-epóxido **76** (Figura 19) es un intermedio clave en la síntesis de un gran número de candidatos (71).

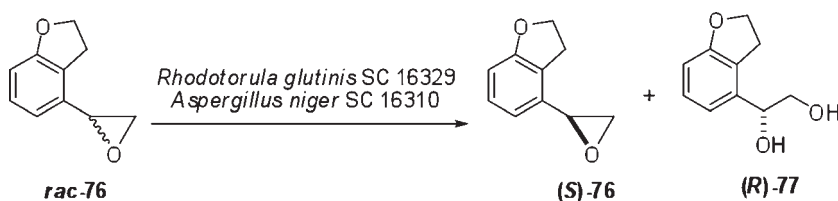


Figura 19. Preparación de los sintones quirales para la obtención de un agonista del receptor de melatonina: hidrólisis enantioselectiva de un epóxido racémico **rac-76** al correspondiente (*R*)-diol **77**.

Así, se llevó a cabo la hidrólisis enantioespecífica del racémico 1-[2',3'-dihidro benzo[b]furan-4'-il]-1,2-oxirano **rac-76** al correspondiente diol **77**, obteniendo a su vez el (*S*)-epóxido que no reaccionó (**S**)-**76** (72). Dos cepas de *A. niger* (SC 16310 y SC 16311) y *Rhodotorula glutinis* SC 16293 hidrolizaron selectivamente el (*R*)-epóxido, sin tocar el (*S*)-epóxido **76** con un e.e. mayor del 95% y un rendimiento del 45%. Por otra parte se probaron distintos disolventes al 10% en orden a mejorar la enantioselección y el rendimiento. Los

disolventes tuvieron efectos significativos sobre el grado de hidrólisis y el e.e. del (S)-epóxido **76** que no reaccionó. No obstante, la mayoría de los disolventes dieron un menor e.e. del producto y menor tasa de reacción que las reacciones sin ningún disolvente, excepto el *terc*butil metil éter (MTBE), que condujo a un rendimiento del 45% y un e.e. del 99,9% para (S)-epóxido (S)-**76**.

9. AGONISTAS DEL RECEPTOR β -3

Los receptores adrenérgicos β -3 se encuentran sobre las superficies de las células de los adipocitos blancos y marrones y son responsables de la lipólisis, termogénesis y relajación del músculo liso del intestino (73). Consecuentemente, distintos grupos de investigación se encuentran desarrollando agonistas β -3 selectivos para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, diabetes tipo II y obesidad (74, 75). Se ha comprobado que fueron necesarias tres síntesis biocatalíticas diferentes de intermedios quirales para la síntesis total del receptor agonista β -3 **80** (Figura 20) (76) aunque sólo describiremos aquí la realizada por la esterasa de hígado de cerdo.

9.1. Hidrólisis enantioselectiva del 2-metil-2(4-metoxifenil)succinato de dietilo

El monoéster (S)-**79** (Figura 20) es un intermedio clave para la síntesis del receptor agonista β -3 **80**. La hidrólisis enzimática enantioselectiva del diéster **78** al buscado monoéster (S)-**79** se ha llevado a cabo utilizando esterasa de hígado de cerdo (76).

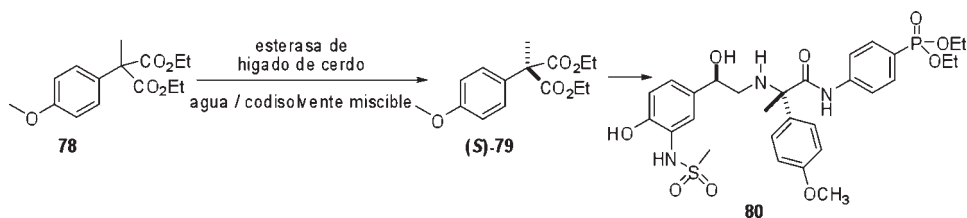


Figura 20. Hidrólisis enzimática enantioselectiva del 2-metil-2(4-metoxifenil)succinato de dietilo **78** al monoéster (S)-**79**.

Los rendimientos de reacción y e.e. del monoéster **(S)-79** fueron dependientes del disolvente utilizado. Así, se obtuvieron altos valores de exceso enantiomérico (> 91%) con metanol, etanol, y tolueno como co-disolventes. Más concretamente, el etanol permitió el rendimiento más alto (96,7%) y el mayor e.e. (96%) para el monoéster buscado **(S)-79**. Asimismo, se observó que el e.e. de este compuesto se incrementó al disminuir la temperatura de 25 a 10° C, cuando la biotransformación se realizó en un sistema bifásico usando etanol como cosolvente. Una hidrólisis a escala semipreparativa de 30 g se llevó a cabo usando 10% de etanol como codisolvente en una mezcla de reacción de 3L (pH 7,2) a 10° C durante 11 horas. Se obtuvo un rendimiento de 96% y un e.e. del 96,9 %.

10. AGONISTAS DEL RECEPTOR β -2

10.1. Acilación enzimática enantioselectiva

El formoterol **85** (Figura 21) es un potente agonista de los receptores β -2, y se comercializa como una mezcla diastereoisomérica a pesar de la variada eficacia de su eutómero. En efecto, la preparación del (*R,R*)-estereoisómero se consiguió por un proceso de resolución enzimática (77).

La (*R*)-bromohidrina **(R)-81** se preparó por una acilación enzimática a partir de un alcohol racémico **81** para formar el producto acetilado **(S)-82** y el producto deseado que no reaccionó **(R)-81** (rendimiento del 46%), usando una lipasa PS-30 de *P. cepacea*. Por su parte, la resolución de la amina *rac*-**83** se consiguió por acilación enzimática, que condujo al producto deseado **(R)-84** y un producto que no reaccionó **(S)-83** usando una lipasa de *Candida antarctica*. El rendimiento total de la reacción fue de tan sólo un 11% con un e.e. del 96%, pero cabe resaltar que la adición de 0,15 equivalentes de trietilamina llevó a un 42% de conversión y un 94% de e.e. en tan sólo cuatro horas. La hidrólisis y posterior purificación cromatográfica de **(R)-84** proporcionó la amina libre con un rendimiento del 21% y un e.e. del 94%. Seguidamente, se llevó a cabo el acoplamiento de los dos intermedios quirales dando lugar al (*R,R*)-formoterol.

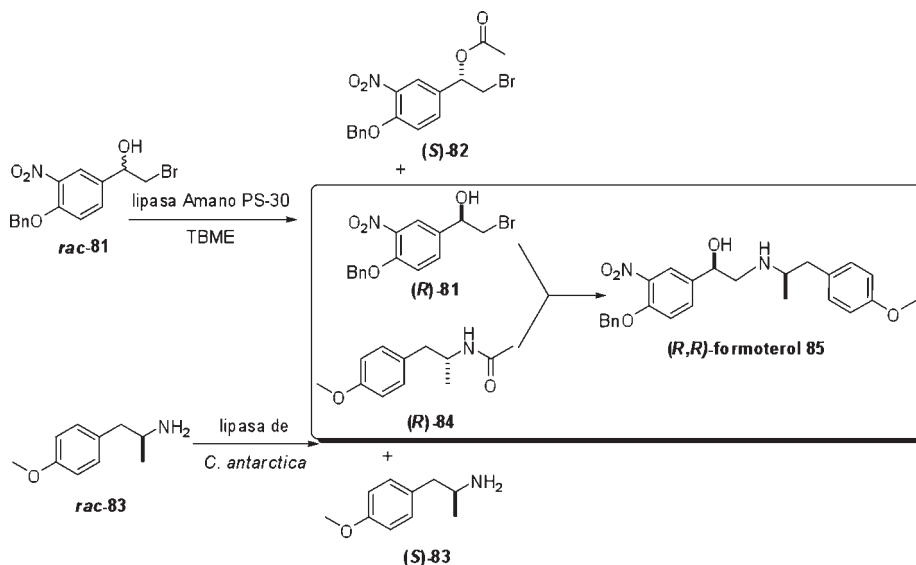


Figura 21. Síntesis enzimática de los sintones quirales (**(R)**-81 y (**(R)**-84 necesarios para la obtención del (**(R,R)**)-formoterol 85.

11. INHIBIDORES DE LA TRIPTASA

11.1. Preparación enzimática del S-N.(*tert*-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina

La S-N(*tert*-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina (**(S)**-86 (Figura 22) es un intermediario clave en la síntesis de un inhibidor muy potente de la triptasa (78). Dicho compuesto se obtuvo por cristalización fraccionada de la correspondiente sal distereosiomérica con el L(-)-tartrato de dibenzoilo, seguida de una hidrólisis y esterificación (79). La lipasa de *P. cepacea* resultó ser la mejor enzima para llevar a cabo la resolución estereoespecífica de la (*rac*)-N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina *rac*-86.

El compuesto (**(S)**-86 se obtuvo con un rendimiento del 16% y un e.e. mayor al 95% por hidrólisis del (*R,S*)-acetato catalizado por la lipasa PS de *P. cepacea*. Dicha lipasa también catalizó la esterificación del (*R,S*)-N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-hidroximetilpiperidina *rac*-86 con anhídrido succínico 87 dando el compuesto (**(R)**-86 y el

éster hemisuccínico **(S)**-86, el cual puede ser fácilmente separado del anterior e hidrolizado en medio básico para rendir **(S)**-86. El rendimiento y el exceso enantiomérico se incrementa mucho repitiendo el proceso. Tras usar el proceso repetido de esterificación/resolución el **(S)**-86 se obtuvo con un rendimiento del 32% y un 98,9 de e.e. (80).

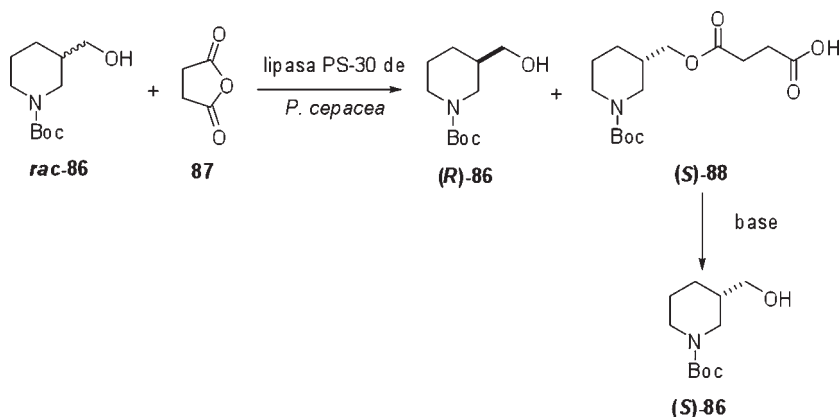


Figura 22. Síntesis enzimática del sintón quiral **(S)**-86 necesario para la obtención de inhibidores de la triptasa.

12. FÁRMACOS ANTI-ALZHEIMER

12.1. Preparación enzimática de **(S)**-2-pentanol y **(S)**-2-heptanol

El **(S)**-2-pentanol **(S)**-89 (Figura 23) es un intermedio en la síntesis de varios potentes fármacos anti-Alzheimer que inhiben la liberación del péptido β -amiloide y/o su síntesis (81, 82). La lipasa de *Candida antarctica* se ha descrito como eficaz en la resolución enzimática del 2-pentanol racémico **(rac)**-89 y 2-heptanol **(rac)**-91 (83).

Para dictaminarlo, se hizo un cribado de las lipasas comercialmente disponibles para llevar a cabo la acetilación enantioselectiva del 2-pentanol racémico en hexano y en presencia del acetato de vinilo como donador de acilo. De entre las varias probadas, la lipasa de *Candida antarctica* B dio un rendimiento de reacción del 49% y un 99% de

exceso enantiomérico para el (S)-2-pentanol (**(S)**-89 a una concentración de 100 g/l de sustrato. Entre todos los agentes acilantes ensayados, se eligió el anhídrido succínico **87**, debido a la facilidad para separarlo del (S)-2-pentanol al final de la reacción. Usando 0,68 moles de anhídrido succínico y 13 g de lipasa B por kilo de 2-pentanol racémico, se obtuvo un rendimiento máximo de reacción de 43% y un exceso enantiomérico superior al 98% para el (S)-2-pentanol, aislado con un rendimiento total del 38%. La resolución del 2-heptanol (**(rac)**-91 fue realizada utilizando lipasa B en condiciones similares para dar un rendimiento máximo del 44% y un e.e. > del 99% de (S)-2-pentanol (**(S)**-91, aislado con un rendimiento total del 40%.

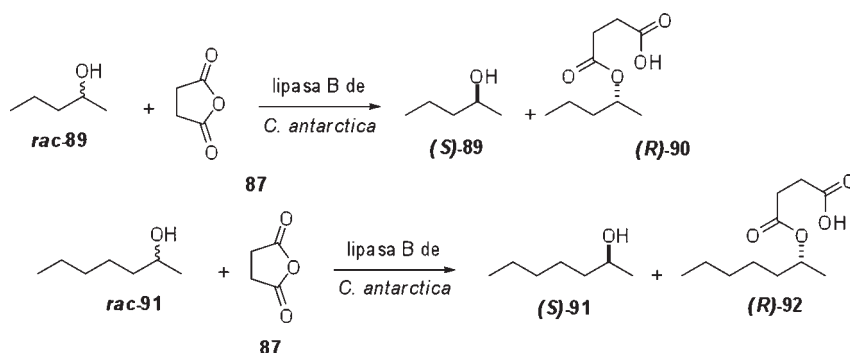


Figura 23. Síntesis enzimática para la obtención de intermedios en la síntesis de fármacos antialzheimer: resolución enzimática de rac-2-pentanol (**(rac)**-89) y rac-2-heptanol (**(rac)**-90) a través de acilación enantioselectiva.

12.2. Preparación enzimática de (S)-5-hidroxi hexanonitrilo

El (S)-5-hidroxi hexanonitrilo (**(S)**-93, Figura 24, es un intermedio quiral clave en la síntesis de fármacos. La resolución enzimática del producto racémico 5-hidroxi hexanonitrilo (**(rac)**-93 se llevó a cabo por succinilación utilizando lipasa inmovilizada PS-30 como biocatalizador para obtener (**(S)**-93 con un rendimiento del 35%. El (S)-5-acetoxi hexanonitrilo (**(S)**-94 fue preparado por hidrólisis enzimática enantioselectiva del producto racémico 5-acetoxi hexanonitrilo (**(rac)**-94 utilizando lipasa de *C. antarctica* obteniendo un rendimiento del 42% y un exceso enantiomérico superior al 99% (84).

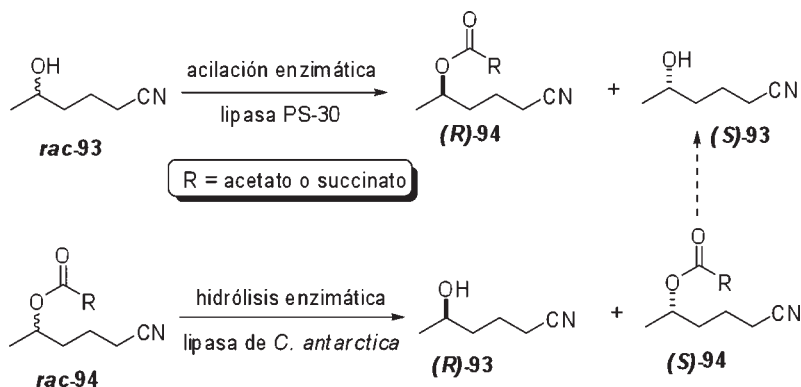


Figura 24. Síntesis enzimática para la obtención de intermedios en la síntesis de fármacos antialzheimer: resolución enzimática de 5-hidroxi hexanonitrilo (**rac-93**) y 5-acetoxi hexanonitrilo (**rac-94**) a través de acilación e hidrólisis enantioselectiva, respectivamente.

Un gran número de estudios han demostrado que los derivados de la vitamina A (retinoicos) son esenciales para el crecimiento normal, visión, homeostasis de los tejidos y reproducción (85). El ácido retinoico y sus análogos naturales y sintéticos ejercen una gran variedad de efectos biológicos por unión o activación de un receptor específico o conjunto de receptores (86). Estos compuestos han mostrado ejercer un efecto sobre el crecimiento celular y la diferenciación, y son fármacos prometedores para el tratamiento de cánceres (87). De estos compuestos, sólo unos pocos tienen uso clínico para el tratamiento de enfermedades dermatológicas como el acné y la psoriasis (88), o para su uso en dermatología y cáncer (89). En este sentido, el (*R*)-2-hidroxi-(1',2',3',4'-tetrahidro-1',1',4',4'-tetrametil-6-naftalenil) acetato de etilo **R-96** (Figura 24) y el correspondiente ácido **R-97** fueron preparados como intermedios en la síntesis del agonista del receptor gamma específico del ácido retinóico **98** (90).

El producto **R-96** fue obtenido por reducción enantioselectiva, a partir del oxoéster **95**. Al final de la reacción, el hidroxiéster **R-96** fue adsorbido sobre resina XAD-16 y después de la filtración fue recuperado en un 94% de rendimiento de la resina mediante extracción con acetonitrilo. El hidroxiéster **R-96** así recuperado fue tratado con Chirazyme L-2 o esterasa de hígado de cerdo (pig-liver esterase) para, en una hidrólisis muy suave, convertirlo al correspondiente (*R*)-hidroxiá-

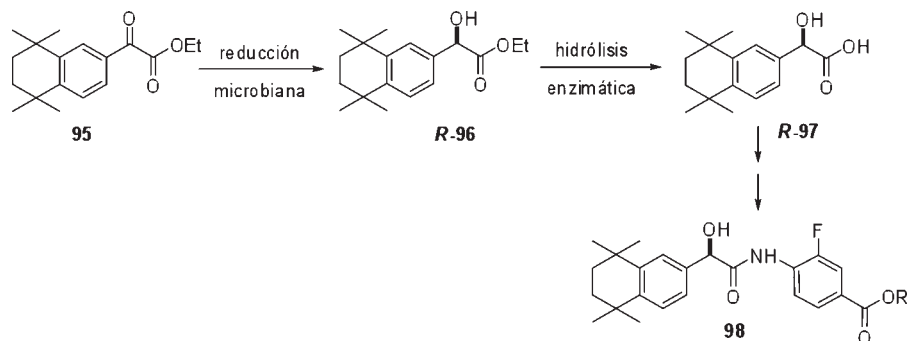


Figura 25. Obtención del hidroxiácido **R-97** para su posterior transformación en el compuesto **98**, agonista del receptor gamma específico del ácido retinoico.

cido **R-97** con rendimiento cuantitativo, el cual posteriormente condujo al producto desado **98**.

13. ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR $\alpha 1$ -ADRENÉRGICO

13.1. Esterificación enzimática y amonolisis

El Afuzosin (**102**, Figura 26) es un derivado de quinazolina que actúa como un potente y selectivo antagonista del receptor $\alpha 1$ -adrenérgico produciendo la contracción de la próstata y de la cápsula prostática, y reduciendo los síntomas asociados con la hipertrofia prostática benigna (91). Se han propuesto varias rutas para la síntesis química del afuzosin, con tetrahydro-*N*-[3-(metilamino)propil]-2-furanocarboxamida **101** como intermedio (92). A su vez, la síntesis de esta amida partir del correspondiente ácido 2-tetrahidrofurónico **99** es dificultosa, pues utiliza reactivos muy tóxicos así como condiciones muy drásticas (93). Dado que se han descrito reacciones de amonolisis de ésteres catalizadas por lipasas usando amoniaco o aminas como nucleófilos (94), y estas son muy suaves, se aplicó dicha estrategia.

En este sentido, se ha descrito el proceso catalizado por una lipasa para la conversión en un solo paso de ácidos carboxílicos en las amidas sustituidas a través de la formación *in situ* del éster etílico y la posterior amonolisis (95). El proceso fue optimizado para la prepara-

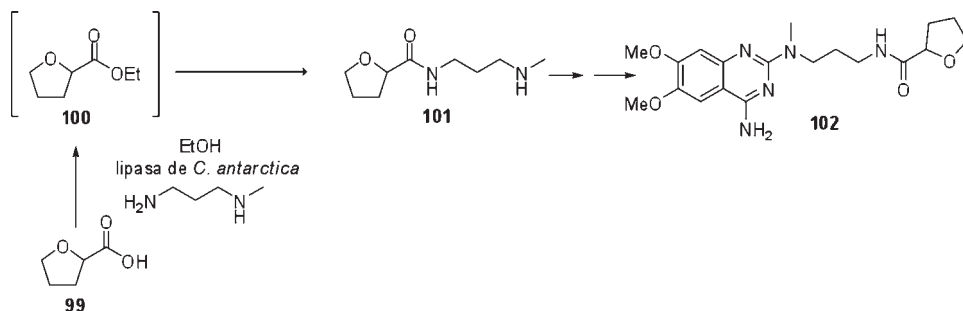


Figura 26. Obtención del intermedio tetrahidro-N-[3-(metilamino)propil]-2-furanocarboxamida por esterificación y aminólisis *in situ* del ácido **99**. Síntesis de precursores del afuzosin **102**.

ción de **101** y conllevó el tratamiento del correspondiente ácido carboxílico **99** con etanol para preparar el éster **100** en presencia de la lipasa de *C. antarctica* inmovilizada por adición de N-metil-1,3-propandiamina. La amida **101** fue así obtenida con un rendimiento del 72%, y la enzima inmovilizada fue utilizada durante ocho ciclos en este proceso sin pérdida considerable de actividad.

El proceso se ha demostrado que es general y puede ser aplicado a ácidos de cadena abierta, ciclos, amino, dicarboxílicos e insaturados (95). La enzima muestra un comportamiento regioselectivo en relación a grupos amino primarios y secundarios.

14. FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS

14.1. Preparación enzimática de 6-hidroxibuspirona

La Buspirona (Buspar **105**, Figura 27) es un fármaco usado en el tratamiento de la ansiedad y depresión que produce su efecto por unión al receptor de serotonina 5HT1A (96). Principalmente como resultado de las reacciones de hidroxilación, se degrada a varios metabolitos (97) y las concentraciones en sangre vuelven a niveles bajos a las pocas horas de tomar la dosis.

Uno de los metabolitos principales, la 6-hidroxibuspirona, **104**, producida por la acción del citocromo P450 CYP3A4 del hígado, está

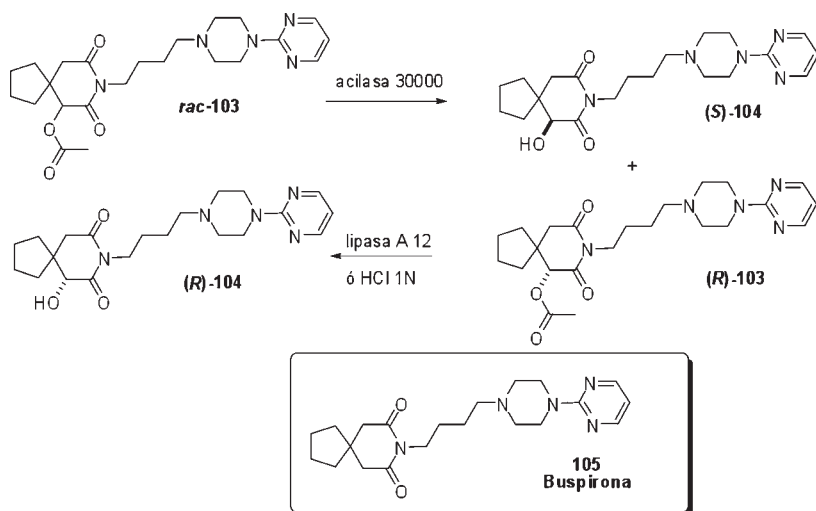


Figura 27. Preparación enzimática de la (R) y (S)-6-hidroxibupirona ((**R**)-**104** y (**S**)-**104**) por un proceso de resolución cinética.

presente en mayores concentraciones en la sangre en humanos que la propia bupirone. Este metabolito tiene efectos ansiolíticos, lo cual se ha comprobado utilizando como modelo crías de ratas, y se une al receptor humano 5HT1A (98). A pesar de que el metabolito tiene sólo una tercera parte de la afinidad de la bupirone por el receptor humano 5HT1A, está presente en la sangre humana en concentraciones 30 ó 40 veces mayores que la bupirone, por lo que podría ser responsable de gran parte de la efectividad del fármaco (99). Para el estudio de la 6-hidroxibupirone como un potencial fármaco ansiolítico, se precisaba la preparación y análisis de los dos enantiómeros por separado, así como el racémico. Los dos enantiómeros (**R**)-**104** y (**S**)-**104**, aislados por HPLC quiral, fueron efectivos usando un modelo ansiolítico en ratas (100). Así, mientras que el enantiómero (**R**)-**104** mostró una unión mas fuerte y específica para el receptor 5HT1A, el enantiómero (**S**)-**104** tenía la ventaja de que era mas fácilmente eliminado de la sangre.

Debido, pues, al distinto comportamiento de ambos isómeros, se ha desarrollado un proceso enzimático para la resolución de la 6-acetoxibupirone **rac-103**. La L-aminoacilasa de *Aspergillus melleus* (acilasa de Amano 30000) fue usada para hidrolizar 6-acetoxibupirone

racémica al enantiómero (**S**)-**104** con un 96% de exceso enantiomérico y 46% de conversión. Por su parte, el enantiómero remanente (**R**)-**104** fue convertido a (*R*)-6-hidroxibuspirona por hidrólisis ácida con un 84% de e.e. La pureza óptica de ambos enantiómeros podría ser mejorado hasta más del 99% por cristalización como un polimorfo metaestable (101).

15. DESPROTECCIÓN ENZIMÁTICA ENANTIOSELECTIVA DE GRUPOS CARBOBENCIOXI

Los grupos amino requieren con frecuencia protección durante las transformaciones sintéticas; al mismo tiempo, los grupos protectores deben ser eliminados. La protección enzimática y desprotección bajo condiciones suaves se ha llevado a cabo previamente. Las penicilin-G amidasa y la ftaloil amidasa se han utilizado para la desprotección enzimática de los grupos fenil acetilo y ftaloilo del correspondiente compuesto amido o imido (102, 103). Además, las acilasas han sido ampliamente usadas en la desprotección enantioselectiva de *N*-acetil-DL-aminoácidos (104), mientras que la desprotección enzimática de *N*-carbamoil *L*-aminoácidos y *N*-carbamoil *D*-aminoácidos ha sido realizada por *L*-carbamoilasas, respectivamente (105, 106).

El grupo carbobenciloxi (Cbz) se usa normalmente para proteger grupos amino e hidroxilos durante la síntesis orgánica. La desprotección química es normalmente realizada por hidrogenación con un catalizador de paladio (107, 108). No obstante, durante la desprotección química, algunos grupos son reactivos (e.g.: dobles enlaces carbono-carbono) o podrían interferir (e.g.: tioles o sulfuros) con las condiciones de hidrogenólisis. Por ello, se han desarrollado procesos de protección enzimática enantioselectiva que pueden ser llevados a cabo bajo condiciones suaves sin dañar otros grupos reactivos de la molécula. Así, en un *screening* de diferentes suelos se aisló e identificó la cepa *S. paucimobilis* SC 16113; este cultivo catalizó la ruptura enantioselectiva de grupos CBz (Figura 28) de varios aminoácidos Cbz-protégidos **rac-106** (109).

Solo los Cbz-*L*-aminoácidos protegidos fueron desprotegidos dando una conversión completa al correspondiente *L*-aminoácido **S-107**. Los Cbz-*D*-aminoácidos dieron un rendimiento menor del 2%. Los

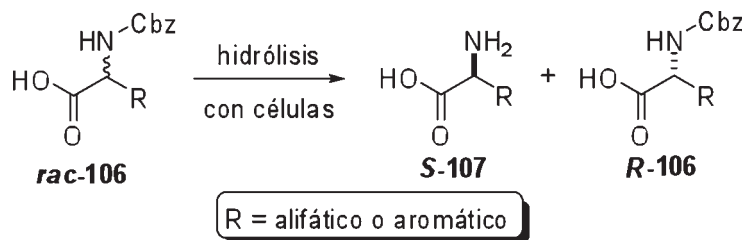


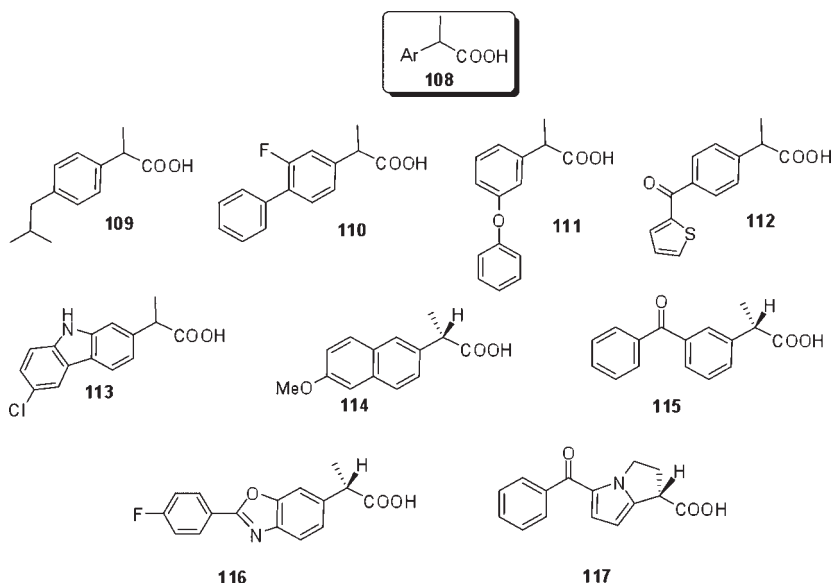
Figura 28. Desprotección de aminoácidos N-carboxybenzoilados **rac-106** con un proceso enzimático.

Cbz-aminoácidos racémicos fueron también evaluados como sustratos para la hidrólisis por extractos de células de *S. paucimobilis* SC 16113. Como hemos anticipado, sólo el *L*-enantiómero fue hidrolizado, dando el *L*-aminoácido en un rendimiento mayor del 48% y un e.e. mayor del 99%. Los Cbz-*D*-aminoácidos que no reaccionaron fueron recuperados con un rendimiento mayor del 48% y un e.e. mayor del 98% (109). Esta enzima, de enorme interés por su gran selectividad, ha sido clonada y sobreexpresada en *E. coli* (110).

16. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROÍDICOS: ÁCIDOS 2-ARIL PROPIÓNICOS (PROFENOS)

Las enfermedades reumatoides incluyen una serie de procesos tales como artrosis, artritis reumatoide, dolores en columna vertebral, lumbago, etc., y presentan una alta incidencia de bajas laborales. En España, a principios de los noventa, se calculaba que aproximadamente un 25% de la población comprendida entre cuarenta y seis y sesenta años sufría alguna de estas patologías, y el porcentaje se elevaba a cerca de un 30% para trabajadores mayores de sesenta años, con unos altos costes laborales causados por bajas atribuidas a estos procesos (111). Estudios más recientes estiman que, por ejemplo, la artritis reumatoide afecta a aproximadamente al 0,5% de la población española mayor de veinte años (112), y que la artrosis afecta a un porcentaje entre el 15 y el 20% de dicha población (113).

Estos procesos inflamatorios se tratan con diferentes tipos de fármacos, entre los cuales los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos, de estructura genérica **108**, Figura 29) presentan una gran importancia.

**Figura 29.**

Entre ellos, citaremos el Ibuprofeno **109**, Flurbiprofeno **110**, Fenopropfeno **111**, Suprofen **112**, Carprofeno **113**, Naproxeno **114**, Dexketoprofeno **115**, Flunoxaprofeno **116** o el Ketorolaco **117** (comercializado como sal con trometamina bajo el nombre de Toradol).

La actividad de estos fármacos está asociada a su capacidad de inhibir la ciclooxygenasa, responsable de la biotransformación del ácido arquidónico hasta prostaglandinas o tromboxanos (ver Apartado 5). Numerosos estudios farmacológicos acerca de la actividad terapéutica de los dos enantiómeros de estos compuestos han demostrado que el isómero *S*(+) no sólo tiene un mayor poder antiinflamatorio [28 veces en el caso del Naproxeno (**114**) o 160 veces para el *S*(+) Ibuprofeno] frente a su antípoda *R*(-) (**115**), el cual esencialmente inactivo como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (**116**), aunque puede tener efecto analgésico por mecanismos diferentes (**117**), sino que también el eutómero *S*(+) alcanza su concentración terapéutica en sangre antes que el racemato (**118**). No obstante, sólo el Naproxeno **114**, Dexketoprofeno **115**, Flunoxaprofeno **116** y el Ketorolaco **117** se venden como enantiómeros puros, mientras que el más vendido de todos, el Ibuprofeno **109**, se comercializa como racémico.

De entre las diferentes metodologías descritas para la obtención enantioselectiva del eutómero *S* de estos compuestos, la utilización de hidrolasas que catalicen, bien la hidrólisis enantioselectiva de derivados racémicos de los profenos, bien la esterificación enantioselectiva de los mismos, es una interesante alternativa. De entre los múltiples ejemplos que están descritos en la bibliografía (para una revisión, ver referencia 118), seleccionaremos alguno de los más destacados.

16.1. Síntesis de *S*(+)-Ibuprofeno

La compañía norteamericana Sepracor ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del eutómero *S*(+)-Ibuprofeno **S-109**, partiendo de una mezcla racémica del correspondiente éster metoxietílico *rac*-**118** (Figura 30), catalizado por la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada en los poros de un reactor de membrana.

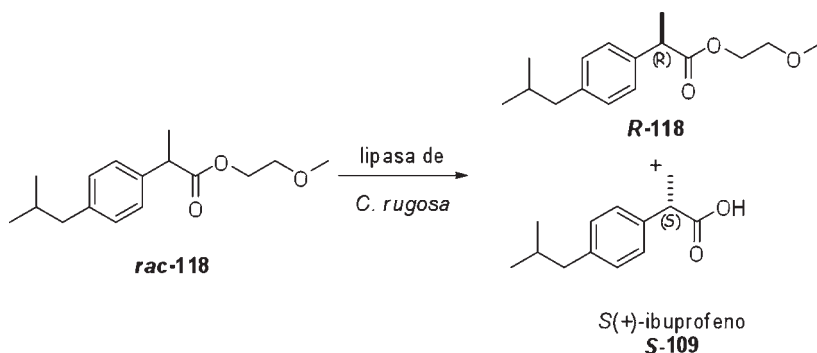


Figura 30. Obtención del *S*(+)-ibuprofeno **S-109** por hidrólisis del éster racémico *rac*-**118**.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 20° C, y a pH = 5, puesto que, aunque la lipasa muestra actividad en un amplio intervalo de valores de pH, se necesita un medio ácido para que disminuya la solubilidad del Ibuprofeno, puesto que la enzima se inhibe por exceso de producto. El principal inconveniente del proceso, la baja solubilidad de los productos en medio acuoso (por debajo de 1 mM para el *rac*-**118**) que implicaría operar con reactores de gran volumen se elimina trabajando en un reactor de fibra hueca, donde la lipasa está

atrapada no covalentemente en los poros de una membrana que separa un sistema bifásico agua-disolvente orgánico. Así, el sustrato **rac-118** se disuelve en la fase orgánica, y se circula por el exterior de la membrana, donde es convertido por la enzima y el correspondiente ácido se extrae a la fase acuosa. Posteriormente, un segundo reactor de membrana, fijado a un pH alto, permite la separación del producto **S-109** del enantiómero del éster que no ha reaccionado, **R-118**, el cual puede recircularse, lo que permite alcanzar altas productividades volumétricas (119).

16.2. Síntesis de S(+)-Naproxeno

Siguiendo una estrategia semejante a la descrita en el apartado anterior, la obtención del S-Naproxeno **114** se ha descrito mediante una hidrólisis enantioselectiva del correspondiente éster metílico racémico **rac-119** (Figura 31). La enzima empleada fue la esterasa NO, una carboxilesterasa recombinante, la cual, acoplada a un proceso de racemización del éster no reconocido (**R-119**) catalizado por una base permite obtener unos excelentes resultados tanto de rendimiento como de pureza óptica (120).

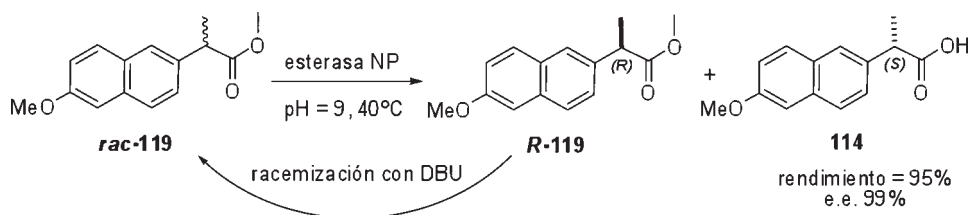


Figura 31. Obtención del S-Naproxeno **114** por hidrólisis del éster racémico **rac-119**.

17. CONCLUSIONES

De todos los ejemplos indicados en el presente trabajo queda manifiestamente demostrado el gran potencial que representa el uso de las biotransformaciones en la obtención de fármacos o de intermedios homóquiales, máxime considerando que la revisión aquí planteada

no pretende ser exhaustiva, pues solamente se han comentado (y no todos, obviamente) ejemplos en los cuales se encuentran implicadas las hidrolasas. Existen una gran multitud de otros casos en los cuales son otras enzimas (oxidorreductasas, transferasas, liasas...) las responsables de la obtención de los compuestos de interés terapéutico, por lo que lo aquí mostrado no es sino la punta de un iceberg que debe emerger de manera indudable en los próximos años. En efecto, cuando muchas de las industrias farmacéuticas deban adecuar sus procesos a normativas medioambientalmente menos contaminantes, sin duda volverán sus ojos hacia los procesos biocatalizados, los cuales permitirán un desarrollo mucho más sostenible.

18. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Real Academia Nacional de Farmacia la concesión del premio Juan Abelló otorgado en la edición de 2008 de su concurso científico.

19. BIBLIOGRAFÍA

1. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. (1999) *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Wiley-VCH.
2. Patel, R. N. (2000) *Stereoselective Biocatalysis*. Dekker.
3. Drauz, K. & Waldmann, H. (2002) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Vols. 1-3, 2nd edn), Wiley-VCH.
4. Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. (2004) *Biocatalysis* (Vol. 1), Wiley-VCH.
5. Faber, K. (2004) *Biotransformations in Organic Chemistry* (5th ed.). Springer.
6. Cao, L. (2005) *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. Wiley-VCH.
7. Buchholtz, K., et al. (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH.
8. Liese, A.; Seelbach, K. & Wandrey, C. (eds.) (2006) *Industrial Biotransformations*, 2.^a ed. Wiley-VCH.
9. Schmid, A., et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 409: 258-268.
10. Schoemaker, H. E., et al. (2003) Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science*. 299: 1694-1697.
11. Rouchi, M. A. (2002) Chiral roundup. *Chem. Eng. News*. 80: 43-50.
12. Caldwell, J. (1999) Through the looking glass in chiral drug development. *Modern Drug Discov*. 2: 51-60.
13. Eichelbaum, M., Testa, B. & Somogyi, A. (eds.) (2002) *Stereochemical Aspects of Drug Action*, Springer.

14. Ariens, E. J. (1984) Stereochemistry: a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26: 663-668.
15. Eichelbaum, M. & Gross, A. S. (1996) Stereochemical aspects of drug action and disposition. *Adv. Drug Res.* 28: 1-64.
16. Caldwell, J. & Leonard, B. E. (2001) The enantiomer debate: realising the potential of enantiomers in pharmacology. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 16 (Suppl. 2): S65-S107.
17. Stinson, S. C. (2001) Chiral chemistry. *Chem. Eng. News.* 79: 45-56.
18. Agranat, I.; Caner, H. & Caldwell, J. (2002) Putting Chirality To Work: The Strategy of Chiral Switches. *Nature Reviews Drug Discovery.* 1: 753-768.
19. Wrotnowski, C. (1997) Unexpected niche applications for industrial enzymes drives market growth. *Gen. Eng. News.* 1: 14-30.
20. Kazlauskas, R. J. (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Op. Chem. Biol.* 9: 195-201.
21. Ireland, C., *et al.* (1997) Lobucavir: antiviral. *Drugs Future.* 22: 359.
22. Hanson, R., *et al.* (2000) Regioselective enzymatic aminoacylation of lobucavir to give an intermediate for lobucavir prodrug. *Bioorg. Med. Chem.* 8: 2681.
23. Zhang, J., *et al.* (1995) Bioconversion of indene to trans-2S, 1S-bromindanol and 1S,2R-indene oxide by a bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 244.
24. Holton, R., *et al.* (1995) Semisynthesis of taxol and taxotere, in *Taxol Science and Application*, Suffness, M., Ed., CRC Press, New York.
25. Baldini, E., *et al.* (2004) Multicenter randomized phase III trial of Epirubicin plus Paclitaxel vs. Epirubicin followed by Paclitaxel in metastatic breast cancer patients: focus on cardiac safety. *Br. J. Cancer.* 91: 45.
26. Patel, R. N. (1995) Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 98: 361.
27. Patel, R. N., *et al.* (1994) Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side-chain synthon. *Biotech. Appl Biochem.* 20: 23.
28. Baloglu, E. & Kingston, D. (1999) The taxane diterpenoids. *J. Nat. Prod.* 62: 1068.
29. Rose, W. (2001) Preclinical pharmacology of BMS-275183, an orally active taxane. *Clin. Cancer Res.* 7: 2016.
30. Holton, R.; Nadizadeh, H. & Beidiger, R. (1993) Preparation of substituted taxanes as antitumor agents, Eur. Patent Appl. 17 pp. EP 534708 A1 19930331 CAN 119:49693 AN 1993:449693.
31. Umezawa, H., *et al.* (1981) Structure of an antitumor antibiotic. Spergualin. *J. Antibiot.* 34: 1622.
32. Umeda, Y., *et al.* (1987) Synthesis and antitumor activity of spergualin analogues, III: novel method for synthesis of optically active 15-deoxyspergualin and 15-deoxy-11-O-methylspergualin. *J. Antibiot.* 40: 1316.
33. Patel, R. N.; Banerjee, A. & Szarka, L. J. (1997) Stereoselective acetylation of racemic 7-[N,N'-bis(benziloxycarbonyl)-N-(guanidinoheptanoyl)]-7'-hidroxi-glicina. *Tetrahedron Asymmetry.* 8: 1767.

34. Nemoto, K., *et al.* (1987) Effect of 15-deoxyspergualin on graft-v-host disease in mice. *Trans. Proc.* 19(5): 3985.
35. Mahmoudian, M.; Eaddy, J. & Dawson, M. (1999) Enzymic acylation of 506U78 (2-amino-9- β -D-arabinofuranosyl-6-methoxy-9H-purine), a powerful new anti-leukaemic agent. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2: 229-233.
36. Ondetti, M. A. & Cushman, D. W. (1981) Inhibition of rennin-angiotensin system: a new approach of the theory of hypertension. *J. Med. Chem.* 24: 355.
37. Ondettri, M. A., *et al.* (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196: 441.
38. Cushman, D. W. & Ondetti, M. A. (1980) Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharm.* 29: 1871.
39. Goodhue, C. T. & Schaeffer, J. R. (1971) Preparation of L-(+)- β -hydroxybutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 203.
40. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective enzymatic hydrolysis of "[acetylthio]methyl]benzenepropanoic acid and 3-acetylthio-2-methylpropanoic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16: 34.
41. Patel, R. N., *et al.* (1991) Stereoselective enzymatic esterification of 3-benzoylthio-2-methylpropanoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 29.
42. Moniot, J. L. (1988) Preparation of N-[2-(mercaptomethyl)propionyl]-L-prolines, U.S. Patent Appl. CN88-100862.
43. Ondetti, M. A.; Miguel, A. & Krapcho, J. (1982) Mercaptoacyl derivatives of substituted prolines, LS. Patent, 4316906.
44. Patel, R. N.; Robison, R. S. & Szarka, L. J. (1990) Stereoselective enzymic hydrolysis of 2-cyclohexyl- and 2-phenyl-1,3-propanediol diacetate in biphasic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 10.
45. Hanson, R. L., *et al.* (1992) Transformation of N-, -CBZ-L-lysine to CBZ-L-oxyllysine using L-amino acid oxidase from *Providencia a1califaciens* and L-2-hydroxy-isocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 599.
46. Hulshof, L. A. & Roskam, J. H. (1989) Phennykglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. European Patent EP0343714. (*Chem. Abstr.* 113, 76603).
47. Matsumae, H.; Furui, M. & Shibatani, T. (1993) Lipase catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *J. Ferm. Bioeng.* 75: 93.
48. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T. & Tosa, T. (1994) Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 78: 59.
49. Furui, M.; Furutani, T.; Shibatani, T.; Nakamoto, Y., Mori, T. H. (1996) A membrane bioreactor combined with crystallizer for production of optically active (2R,3S)-3-(4-metoxifenil) glycidic acid methyl ester. *J. Ferm. Bioeng.* 81: 21.
50. Fishman, A., *et al.* (2001) Enzymatic resolution as a convenient method for the production of chiral resolved materials on an industrial scale. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 256.

51. Sit, S., *et al.* (1990) Synthesis, biological profile, and quantitative structure-activity relationship of a series of novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 33: 2982.
52. Patel, R. N., *et al.* (1993) Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy)hexanoic acid, ethyl ester. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 1014.
53. Patel, R. N., *et al.* (1992) Enantioselective enzymic acetylation of racemic [4-[4",6\$E]]-6-[4,4-bis[4-fluorofenil]3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)-1,3-butadienil] tetrahidro- 4-hidroxi-2H-piren.2.ona. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 56.
54. Steiger, A.; Pyun, H. & Coates, R. (1992) Synthesis and characterization of aza analog inhibitors of squalene and geranylgeranyl diphosphate synthases. *J. Org. Chem.* 57: 3444.
55. Lawrence, M.; Biller, S. & Fryszman, O. (1995) *Preparation of -phosphonosulfinic squalene synthetase inhibitors*. US. Patent 5447922.
56. Patel, R. N., *et al.* (1997) Stereoselective acetylation of 1-(hydroxy)-4-(3 phenyl)butyl]phosphonic acid diethyl ester. *Tetrahedron Asymmetry.* 8: 1055.
57. Nakane, M. (1987) *Preparation and formulation of 7-oxabicycloheptane substituted sulfonamide prostaglandin analog useful in treatment of thrombotic disease*. US. Patent 4,663,336.
58. Ford-Hutchinson, A. W. (1991) Innovations in drug research: inhibitors of thromboxane and leukotrienes. *Clin. Exper. Allergy.* 21: 272.
59. Das, J., *et al.* (1987) Synthesis of optically 7-oxabicyclo [2.2.1]heptanes and assignments of absolute configuration. *Synthesis.* 12: 1100.
60. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective microbial enzymatic oxidation of (exo,exo)-7-oxabicyclo [2,2,1] heptane-2,3-dimethanol to the corresponding chiral lactol and lactone. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 778.
61. Patel, R. N., *et al.* (1992) Stereoselective enzymic hydrolysis of (exo,exo)-7-oxabicyclo[2.2.1] heptane-2,3-dimethanol diacetate ester in a biphasic system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 180.
62. Edwards, O. & Weston, A. H. (1990) Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 417-422.
63. Robertson, D. W. & Steinberg, M. I. (1989) Potassium channel openers: new biological probes. *Ann. Med. Chem.* 24: 91.
64. Hamilton, T. C. & Weston, A. H. (1989) Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. Pharmac.* 20: 1.
65. Ashwood, V. A., *et al.* (1986) Synthesis and antihypertensive activity of 4-(cyclic amido)-2H-1-benzopyrans. *J. Med. Chem.* 29: 2194.
66. Bergmann, R.; Eierniann, V. & Gericke, R. J. (1990) 4-Heterocycloxy-2H-1-benzopyran potassium channel activators. *J. Med. Chem.* 33: 2759.
67. Patel, R. N., *et al.* (1994) Stereoselective epoxidation of 2, 2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitrile. *Bioorg. Med. Chem.* 2: 535.
68. Patel, R. N., *et al.* (1995) Stereoselective acetylation of 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carbonitrile. *Tetrahedron Asymmetry.* 6: 123.
69. Archelas, A. & Furstoss, R. (1999) Biocatalytic approaches for the synthesis of enantiopure epoxides. *Top. Curr. Chem.* 200: 159.

70. Mischitz, M., *et al.* (1995) Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides. *Tetrahedron Asymmetry*. 6: 1261.
71. Catt, J. D., *et al.* (1999) Preparation of benzofuran and dihydrobenzofuran melatonergic agents. US.5856529, CAN 130:11015.
72. Goswami, A., *et al.* (1999) Stereospecific enzymatic hydrolysis of racemic epoxide: a process for making chiral epoxide. *Tetrahedron Asymmetry*. 10: 3167.
73. Arch, J. R. S. (1997) β -3-adrenoceptors and other putative atypical β -adrenoceptors. *Pharmacol. Rev. Commun.* 9: 141.
74. Bloom, J. D., *et al.* (1989) Disodium (R,R) 5-[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl] amino] propyl]-1,3- benzodioxole-2,2-dicarboxylate: a potent β -adrenergic agonist virtually specific for β -3-receptors. *J. Med. Chem.* 35: 3081.
75. Fisher, L. G., *et al.* (1994) BMS-187257, a potent, selective, and novel heterocyclic β -3 adrenergic receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6: 2253.
76. Patel, R. N., *et al.* (1998) Microbial synthesis of chiral intermediates for β -3-receptor agonists. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1473.
77. Campos, F., *et al.* (2000) An efficient enantioselective synthesis of (R,R)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. *Tetrahedron. Asymmetry*. 11: 2705.
78. Bisacchi, G. (1999) Preparation of amidino and guanidino azetildinone compounds as tryptase inhibitors. WO 9967215, A1 19991229, CAN 132:64103, AN 1999:819347.
79. Wirz, B. & Walther, W. (1992) Enzymic preparation of chiral 3-(hydroxymethyl)piperidine derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. 3: 1049.
80. Goswami, A., *et al.* (2001) Chemical and enzymatic resolution of (R,S)-N-(tert-butoxycarbonyl-3-hydroxymethyl)piperidine. *Organic Process. R&D*. 5: 415.
81. Schenk, D., *et al.* (2001) Potential treatment opportunities for Alzheimer's disease through inhibition of secretases and A β immunization. *J. Mol. Neurosci.* 17: 259.
82. Audia, J., *et al.* Preparation of N- (phenylacetyl)di- and tripeptide derivatives for inhibiting β -amyloid peptide release. PCT Int. Appl., WO 9822494, A2 19980528, CAN 129:41414, 126.
83. Patel, R. N., *et al.* (2000) Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1015.
84. Nanduri, V. B., *et al.* (2001) Biochemical approaches to the synthesis of ethyl 5-(S)-hydroxyl hexanoate and 5-(S) hydroxyhexanenitrile. *Enzyme Microb. Technol.* 28 (7&8): 632.
85. Kagechika, H., *et al.* (1988) Retinobenzoic acids, 1: structure-activity relationship of aromatic amides with retinoidal activity. *J. Med. Chem.* 31: 2182.
86. Shudo, K. & Kagechika, H. (1989) Structure-activity relationships of a new series of synthetic retinoids, in Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Dawson, M. I. & Okarnura, W. H., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
87. Moon, R. C. & Itri, L. M. (1984) Retinoids and cancer. *Retinoids*. 2: 327.
88. Kagechika, H., *et al.* (1988) Retinobenzoic acids, 1: structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *J. Med. Chem.* 31: 2182.
89. Belema, M.; Zusi, F. C. & Tramposch, K. M. (2000) Active enantiomer of RAR γ -specific agonist, PCI Int. Appl. WO 0016769 A1 20000330 CAN 132:246379 AN 2000:209902.

90. Patel, R. N., *et al.* (2002) Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1',2',3',4'-tetrahydro-1',1',4',4'-tetramethyl-6'-naphthalenyl)acetic acid and its ethyl ester. *Tetrahedron Asymmetry*. 13: 349.
91. Langer, S. Z. & I-Hicks, P. E. (1984) Alpha-adrenoceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: 547.
92. Manoury, P. M., *et al.* (1986) Synthesis and antihypertensive activity of a series of 4-amino-6,7-dimethoxy-quinazoline derivatives. *J. Med. Chem.* 29: 19.
93. Manoury, P. M.; Binet, J. & Cavero, I. (1982) *Pyridine derivatives and their use in therapeutic*. Eur. Pat. Appl., EP 61379 Al 19820929 CAN 98:89179 AN 1983:89179.
94. Sánchez, V. M.; Rebolledo, F. & Gotor, V. (1997) Candida antarctica lipase catalyzed resolution of ethyl (\pm)-3-aminobutyrate. *Tetrahedron Asymmetry*. 8: 37-40.
95. Baldessari, A. & Mangone, C. P. (2001) One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 11: 335.
96. Jajoo, H. K., *et al.* (1989) Metabolism of the antianxiety drug buspirone in human subjects. *Drug Met. Disposition*. 17(6): 634.
97. Mayol, R. F. (2000) *Buspirone metabolite for the alleviation of anxiety*, Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 484, 161 US 6150365 A 20001121 CAN 133:359250 AN 2000:819478.
98. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *Antianxiety composition using BMY 28674, and preparation thereof* US. Pat. Appl. Publ., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 588,220. U.S. 2003069251 Al 20030410 CAN 138:281 137 AN 2003:282120.
99. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *S-6-Hydroxy-buspirone for treatment of ansiety, depression and related disorders*. U.S. Pat. App Publ.
100. Yevich, J. P., *et al.* (2003) *R-6-hydroxybuspirone for the treatment of anxiety, depression, and other psychogenic disorders*. PCT mt. Appl., WO 2003009851 Al 20030206 CAN 138:131155 AN 2003:97305.
101. Hanson, R. L., *et al.* (2005) Preparation of (R)- and (S)-hydroxybuspirone by enzymatic resolution and hydroxylation. *Tetrahedron Asymmetry*. 16(16): 2711.
102. Waldmann, H., *et al.* (1996) Selective enzymic removal of protecting groups: the phenylacetamide as amino protecting group in phosphopeptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 37: 8725.
103. Costello, C. A., *et al.* (1996) Selective deprotection of phthalyl protected amines. *Tetrahedron Lett.* 37: 7469.
104. Bommarius, A. S., *et al.* (1997) *L*-methionine related *L*-amino acids by acylase cleavage of their corresponding *N*-acetyl-*D,L*-derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. 8: 3197.
105. Ogawa, J. & Shimizu, S. (2000) Stereoselective synthesis using hydantoinases and carbamoylases. In *Stereoselective Biocatalysis*. Patel, R. N., Ed. Marcel Dekker, New York.
106. Ogawa, J., *et al.* (1995) Purification and characterization of *N*-carbamoyl-*L*-aminoacid amidohydrolase with broad substrate specificity from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1039.

107. Sajiki, F. I., *et al.* (1998) The formation of a novel Pd/C-ethylenediamine complex catalyst: chemoselective hydrogenation without deprotection of the *O*-benzyl and *N*-Cbz groups. *J. Org. Chem.* 63: 7990.
108. Royer, G. P., *et al.* (1985) Palladium/polyethylenimine catalysts. *J. Mol. Catal.* 31: 1.
109. Patel, R. N., *et al.* (2003) Enantioselective enzymatic cleavage of *N*-benzyloxy-carbonyl groups. *Adv. Synth. Catalysis.* 345: 830.
110. Nanduri, V. B., *et al.* (2004) Cloning and expression of a novel enantioselective *N*-carbobenzyloxycleaving enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 34 (3&4): 304.
111. «Reumatos'90». (1992) *Estudio sociosanitario sobre las enfermedades reumáticas en España*. Pfizer, S. A., Spain.
112. Sociedad Española de Reumatología. *Artritis reumatoide: guía de la enfermedad para el paciente*: http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias_Paciente/Guia_Artritis.PDF116.
113. Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: guía de la enfermedad para el paciente*: http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias_Paciente/Guia_Artrosis.pdf.
114. Roszkowski, A. P., *et al.* (1971) Anti-inflammatory and analgetic properties of *D*-2-(6'-methoxy-2'-naphthyl)-propionic acid (naproxen). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179: 114-123.
115. Adams, S. S., *et al.* (1976) Pharmacological differences between optical isomers of ibuprofen - evidence for metabolic inversion of (-)-isomer. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 156-157.
116. Caldwell, J., *et al.* (1988) The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochem. Pharmacol.* 37: 105-114.
117. Brune, K., *et al.* (1991) Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia.* 47: 257-261.
118. Alcántara, A. R., *et al.* (2000) Chemoenzymatic preparation of enantiomerically pure S(+) 2-arylpropionic acids with anti-inflammatory activity. *Stereo-selective Biocatalysis*. (Patel, R. N., ed.) 659-702.
119. McConville, F. X., *et al.* (1990) Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor. In: *Biocatalysis* (Abramowicz, D. A., ed.) pp. 167-177, van Nostrand, Reinhold, New York.
120. Quax, W. J. & Broekhuinen, C. P. (1994) Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 425-431.

*** Información de contacto:**

Dr. José María Sánchez Montero.

Grupo de Biotransformaciones (BTG).

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

Teléf.: 91 394 18 20. Fax: 91 394 18 22.

E-mail: jsanchez@farm.ucm.es

The ignored stowaways: worldwide dispersion of exotic microalgae species through the biofouling recovering the ships underwater body

Victoria López-Rodas^{1,2}, Raquel González¹, Eduardo Costas^{1,2*}

¹ Departamento de Genética (Producción Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid (Spain).

² AlgasGen Biotecnología EBT-UCM. Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid (Spain).

Recibido el 13 de abril de 2010.

ABSTRACT

Invasion by introduced species cause huge environmental damage and economic (estimated in \$138 billion in USA). Marine ecosystems are specially affected by introduced species of toxin-producing microalgae. Ships ballast water has been considered the major vector in dispersion of phytoplankton. However, most ships do not use ballast water. Alternatively, we propose that the biofouling recovering the underwater body of ships is the main cause of microalgal dispersion. Antifouling paints (containing tributyltin, TBT or other toxics) are used to coat the bottoms of ships to prevent biofouling. After sampling biofouling recovering the underwater body of ships we demonstrate that numerous coastal, oceanic and toxin-producing microalgae species proliferates attached on bottoms of ships directly on TBT antifouling paint. These microalgae species should be resistant variants because antifouling paints rapidly destroy sensitive wild type microalgae. Consequently, the key to explain microalgae

species transport via ships biofouling is know the mechanisms that allow to these species to survive long time attached to antifouling paint. A fluctuation analysis demonstrate that genetic adaptation by rare spontaneous mutation, which occurs by chance prior to antifouling exposure is the mechanism allowing adaptation of microalgae to antifoulig paints and their dispersion in the ships biofouling. Around 3 TBT-resistant mutants per each 10^{-4} wild type sensitive cells occurs in microalgal population. This assures a rapid colonization of ships bottoms to travel long-distances.

Key words: Adaptation; Biofouling; HABs; Harmful algae; Introduced species; TBT.

RESUMEN

Los polizones ignorados: dispersión por el mundo de las especies de microalgas exóticas mediante el «biofouling» que recubre el fondo de los barcos

La introducción de especies invasoras puede causar grandes problemas medioambientales y económicos (estimados en 138 billones de \$ en USA). Los ecosistemas marinos se ven especialmente afectados por la introducción de microalgas tóxicas. El agua de lastre de los barcos está considerada como el mayor vector de dispersión de fitoplancton. Sin embargo, la mayoría de los barcos no tienen lastre de agua. Como alternativa, proponemos que el biofouling que recubre los barcos es la principal causa de dispersión de microalgas. Se utilizan pinturas antifouling (conteniendo tributil-estaño, TBT u otros tóxicos) para recubrir la obra viva de los barcos previniendo el biofouling. Despues de diversos muestreos de la obra viva en barcos demostramos que numerosas especies de microalgas costeras, oceánicas y productoras de toxinas son capaces de proliferar adheridas a la obra viva de los barcos, directamente sobre la pintura TBT antifouling. Estas microalgas deben ser variantes resistentes porque el TBT rápidamente destruye las microalgas sensibles. Consecuentemente, la clave para explicar el transporte de las especies de microalgas en el biofouling de los barcos es conocer los mecanismos que permiten a las especies sobrevivir mucho tiempo sobre la pintura

antifouling. Un análisis de fluctuación ha demostrado que la adaptación genética debida a raras mutaciones espontáneas, que ocurren anteriormente a la exposición al TBT, es el mecanismo que le permite a las microalgas adaptarse a la pintura antifouling y su posterior dispersión en el biofouling. Hay alrededor de tres mutantes resistentes al TBT por cada 10^{-4} células sensibles en la población. Esto asegura la rápida colonización de la obra viva de los barcos para viajar largas distancias.

Palabras clave: Adaptación; Biofouling; HABs; Algas tóxicas; Especies introducidas; TBT.

1. INTRODUCTION

Numerous introduced species (also called exotic, non-indigenous, or alien species) proliferates worldwide outside its native distributional range usually as a consequence of human activities. Invasion by introduced species can change the functions of ecosystems causing unpredictable emergent novelties, environmental damage and loss in biodiversity (1). Economic cost assigned to introduced species in USA was estimated in \$138 billion (2).

Marine ecosystems are specially affected by introduced species (3). As an example, the introduced algae *Caulerpa taxifolia* represents a major risk for sublittoral Mediterranean ecosystems (4, 5). Invasion of toxin producing phytoplankton is particularly worrisome because of their potentially devastating impacts on aquaculture, fishery and public health (6-8). Ballast water has been considered the major vector by which (mainly phytoplankton) have invaded ecosystems worldwide where they did not previously occur (9-14). Consequently, biocide treatments and other management strategies are carried out in ballast water to minimize introduction of alien species (15, 16).

The hypothesis of ballast water as mechanisms of dispersion of marine organisms is attractive. However, few ships (mainly tankers and containers) used ballast water (17). Most ships (including recreational yachts) do not use ballast water. In contrast, any boat or ship afloat has an underwater body that can be rapidly colonized by thousands of marine species of algae, crustacean and mollusc attaching themselves to the hull forming a dense biofouling.

We propose that the biofouling recovering the underwater body of ships is a source to disperse algal species, which contributes to bio-invasion by alien species at least as efficiently as ballast water.

However, antifouling paints are widely used to coat the bottoms of ships to prevent biofouling. During the 1960s the chemical industry developed efficacious anti-fouling paints using metallic compounds in particular the organotin compounds tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) (reviewed in 18). TBT and TPT are very toxic for algae, crustacean and molluscs. These organotin compounds have been extensively used in ships worldwide. Although some countries recently banned TBT and TPT (19, 20), the alternative antifouling paints are also based on other toxic compounds such as copper salts (20).

In this work we demonstrate that: i) numerous species of microalgae travel great distances forming the biofouling recovering the underwater body of ships, ii) these microalgal species are resistant to anti-fouling paints, and iii) the antifouling paint-resistant microalgae arose by rare spontaneous mutation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling of biofouling recovering the underwater body of ships

Microbiological hyssops were scraped against the TBT-antifouling paint of boats that arriving to Sagunto Port, Valencia, Spain after large oceanic journeys (i.e. From Africa, America). The hyssops were immersed in culture flaks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood NJ, USA) with 20 ml of BG-11 medium (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), and stored at 15 °C in darkness until laboratory identification of microalgae species. Microalgae were identified in fresh samples using settling chambers under and inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.2. Experimental organism

Laboratory experiments were performed with the unicellular *Chlorophyta* (strain *Dc1M*), from the Algal Culture Collection of the Universidad Complutense (Madrid). The strain was grown axenically in cell culture flasks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) with 20 ml of Sigma algal culture medium (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), at 20° C under continuous light of 60 mol photon m⁻² s⁻¹ over the waveband 400-700 nm. It was maintained in mid-long exponential growth by serials transfers of a cell inoculum to fresh medium (once every month). Prior to the experiments, the cultures were re-cloned (by isolating a single cell) to avoid including any previous spontaneous mutants accumulated in the cultures. Cultures were maintained as axenic as possible and only cultures without detectable bacteria were used in the experiments.

2.3. Toxicity test: effect of TBT on growth rate and photosynthesis performance

A stock solution of TBT (Sigma) was prepared in BG-11 medium to obtain serial dilutions of 0, 1, 3, 10, and 30 ppm. Each experimental culture was inoculated with 6×10^6 cells from mid-log exponentially growing cultures. Two replicates of each concentration of TBT, as well as two unexposed controls, were prepared.

The toxic effect of the TBT was estimated by calculating acclimated maximal growth rate (μ) in mid-log exponentially growing cells, derived from the equation:

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \quad (21)$$

where $t = 7$ days, the time that cultures were exposed to different dose of TBT, and N_t and N_0 are the cell numbers at the end and at the start of the experiment, respectively. Experiments and controls were counted blind (i.e., the person counting the test did not know the identity of the tested sample), using a Uriglass settling chamber (Bio-siga, Cona, Italy) and an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss).

The effective quantum yield (Φ PSII) was also measured in triplicates of experiments and controls of both species using a ToxY-

PAM fluorimeter (Walz, Effeltrich, Germany) at seven different time points (0.1, 1, 10, 12, 24, 48 and 72 h). Effective quantum yield was calculated as follows:

$$\Phi \text{ PSII} = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (22)$$

F'_m , F_t , maximum and steady-state fluorescence of light-adapted cells, respectively.

2.4. Fluctuation analysis of TBT-sensitive \rightarrow TBT-resistant transformation

A modified Luria-Delbruck fluctuation analysis (23) was performed to distinguish resistant cells that had their origin in random spontaneous pre-selective mutations (mainly prior to TBT exposure) from those arising through acquired post-selective adaptation (during the exposure to TBT) (Figure 1). Two different sets of experimental cultures were prepared. In the set 1 experiment, 96 culture flasks were inoculated with $N_0 = 10^2$ cells (a number small enough to reasonably ensure the absence of pre-existing mutants in the strain). Cultures were grown in BG-11 medium until $Nt = 1 \times 10^5$ cells and afterwards exposed to TBT. For the set 2 controls, 26 aliquots of 1×10^5 cells from the same parental population growing in BG-11 medium were separately transferred to culture flasks containing TBT. Cultures were observed for 60 d (thereby insuring that one mutant cell could generate enough progeny to be detected), and the resistant cells in each culture (in set 1 and set 2) were counted. The cell count was performed by at least two independent observers.

Two different results can be found in the set 1 experiment, each of them being interpreted as the independent consequence of two different phenomena of adaptation. In the first case (Figure 1, set 1A), the variance in the number of cells per culture could be found to be low if resistant cells arose by physiological adaptation or specific post-selective mutations. Because every cell is likely to have the same chance of developing resistance, inter-culture (flask-to-flask) variation would be consistent with the Poisson model (variance/mean = 1). On the contrary, if high variation in the inter-

culture number of resistant cells is found (variance/mean > 1), it means that resistant cells appeared by random mutations occurring before selection, and the flask-to-flask variation would not be consistent with the Poisson model. Resistant-mutants occurred during the time in which the cultures reached N_t from N_0 cells, prior to TBT exposure (Figure 1, set 1B). The set 2 cultures serve as the experimental control of the fluctuation analysis (Figure 1). Variance is expected to be low, because set 2 samples the variance of the parental population. Thus, if a similar variance/mean ratio between set 1 and set 2 is found, resistant cells arose induced during the exposure to the TBT. If the variance/mean ratio of set 1 is significantly greater than the variance/mean ratio of set 2 (fluctuation), resistant cells arose by rare mutations that occurred before exposure to the TBT.

The fluctuation analysis also allows estimation of the rate of appearance of resistant cells. The proportion of set 1 cultures showing non-resistant cells after TBT exposure (P_0 estimator) was used to calculate the mutation rate (μ) as follows:

$$P_0 = e^{-\mu (N_t - N_0)} \quad (23)$$

where P_0 is the proportion of cultures showing no resistant cells, N_0 and N_t are the initial and the final cell number respectively and μ is the mutation rates (in mutants per cell division).

If the mutation from a normal wild-type TBT-sensitive allele to a TBT-resistant allele is recurrent, and the TBT-resistant allele is detrimental to fitness in the absence of TBT, then new mutants arise in each generation, but most of these mutants are eliminated sooner or later by natural selection, if not by chance (21). At any one time there will be a certain number of resistant mutants that are not yet eliminated. The balance between μ and the rate of selective elimination (s) will determine the average number of such mutants:

$$q = \mu / (\mu + s) \quad (24)$$

where q is the frequency of the TBT-resistant allele and s is the coefficient of selection against TBT-resistant allele calculated as follows:

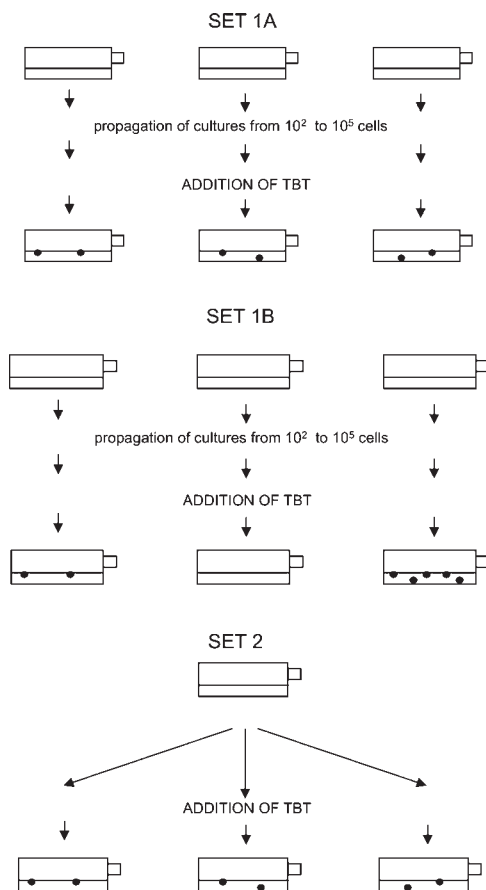


Figure 1. Schematic diagram of possible results obtained in the experiment (modified from the classic Luria-Delbrück fluctuation analysis). In the set 1 experiment, 100 different cultures of *Dc1M* strain (each started from inoculums of $N_0 = 10^2$ cells) were propagated under non-selective conditions (i.e. without TBT) until a very high cell density ($N_t = 10^5$ cells) was reached, and then TBT was added. **Set 1A:** the resistant cells arose in response to TBT during TBT exposure. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar. **Set 1B:** the resistant cells arose by rare spontaneous mutations. Most of these mutations spontaneously arose during the period of the propagation of cultures before to TBT exposure. One mutational event occurred late in the propagation of culture 1 (therefore, the density of TBT-resistant cells found is low) and early in the propagation of culture 3 (thus, density of TBT-resistant cells found is higher than in culture 1); no mutational events occurred in culture 2. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be different. **Set 2** samples the variance of parental populations as an experimental control. In this case, the number of resistant cells in all the cultures must be similar.

$$s = 1 - (m_{TBT}^r / m_{TBT}^s)$$

where m_{TBT}^r and m_{TBT}^s are the Malthusian fitness of TBT-resistant and TBT-sensitive cells measured in non-selective conditions (i.e. BG-11 medium), respectively.

2.5. Growth of TBT-sensitive and TBT-resistant cells on antifouling paint

Bottom of 6 wells-dish plates (Nunclon Delta Surface, Danmark) was painted with TBT- antifouling paint (Hempel, Polinya, Barcelona, Spain). Twenty-four hours latter, cell inoculums of 5×10^5 wild type TBT-sensitive cells or TBT-resistant mutants were respectively transferred to antifouling-painted plates with 10 ml of BG-11 fresh medium. Three plates of sensitive and three plates of resistant cells were maintained at 20° C under continuous light of 60 mol photom $m^{-2} s^{-1}$ over the waveband 400-700 nm. Cultures were observed for 15 days and the final number of cells was counted using a Uriglass chambers and an inverted microscope (Zeiss Axiovert 35).

3. RESULTS

3.1. Microalgae of biofouling recovering the underwater body of ships

Numerous coastal and oceanic microalgae species proliferates on bottoms of ships directly on TBT antifouling paint (Figure 2). Most abundant species were: i) diatoms (Bacillariophyta) from genus *Navicula*, *Nitzschia*, *Asterionella*, *Amphora*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira* and *Rhizosolenia*; ii) Dinoflagellates from genus *Prorocentrum*, *Scrippsiella* and *Amphidinium*; iii) Haptophyta from genus *Primnesium* and *Chrysochromulina*; iv) Chlorophyta from genus *Tetraselmis* and *Dunaliella*; v) cyanobacteria (Cyanophyta) from genus *Synechococcus*; vi) Chlorobacteria from genus *Prochloron*. These microalgae were viable in spite of their contact with the antifouling paint. In addition, resting phases (i.e. dinoflagellates cyst, diatom spores) and early stages of macroalgae (i.e. *Fucus*, *Laminaria*, *Chondrus*, *Codium* and others) were also observed.

Toxin-producing microalgae (i.e. okadaic acid producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*; domoic acid producing diatom *Pseudonitzschia pungens*) and other harmful microalgae (i.e. *Crysochromulina*) were also found attached to the bottoms of the sampled ships.

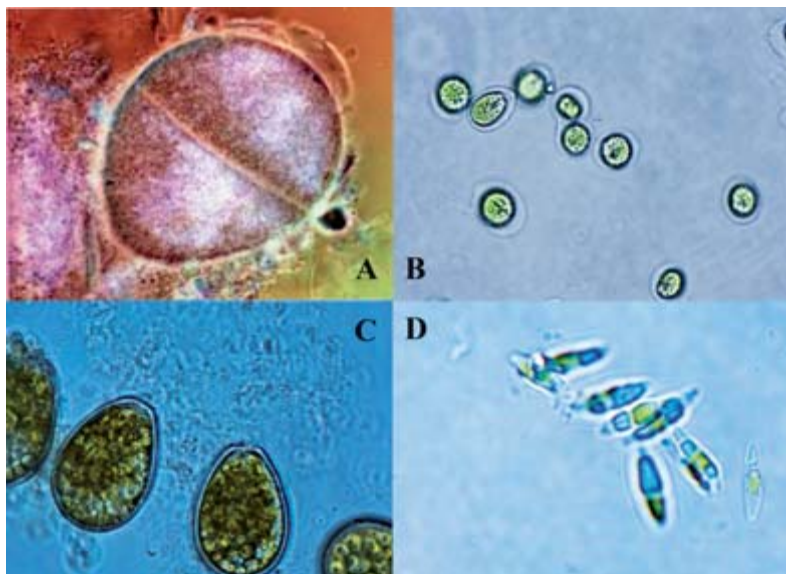


Figure 2. Example of algae of biofouling recovering the underwater body of ships. **A.** Early stage of *Fucus* (Phaeophyta); **B.** *Tetraselmis* sp. (Chlorophyta); **C.** DSP toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (okadaic acid producing); **D.** pennate diatoms (*Pseudonitzschia* sp.).

3.2. Toxic effect of TBT on cells of Dc1M

TBT was extremely toxic for *Dc1M* cells of wild-type genotype. Growth of *Dc1M* cells was irreversibly inhibited by TBT concentrations of 10 ppm. Monitoring changes in photosynthetic performance also assessed the toxic effect of TBT. Only 10 ppm TBT were able to inhibit 79,51% of Φ_{PSII} whereas 30 ppm TBT totally inhibited photosynthesis.

3.3. Fluctuation analysis

When conducting the fluctuation analysis, the cell density of strain *Dc1* was drastically reduced in each experimental culture due to destruction of wild-type cells, by the toxic effect of TBT. However, after further incubation for 60 days, some cultures increased in density again, apparently due to growth of a TBT-resistant variant.

In the case of set 1, only some cultures recovered after 60 days under TBT exposure (Table 1). By contrast, every set 2 culture recovered, indicating the presence of TBT-resistant cells in all cultures. A high fluctuation (variation) in the set 1 experiment (from 0 to more than 10⁵ resistant cells per culture flask) was found (Table 1). In contrast, in set 2 controls all the culture flaks showed from 10⁴ to 10⁵ TBT-resistant cells (a scarce variation due to experimental error), which indicated that the high fluctuation found in set 1 cultures should be due to processes other than sampling error. The fluctuation of set 1 experiment indicates that TBT-resistant cells arose by rare, pre-selective spontaneous mutations rather than by specific adaptation in response to TBT.

Table 1. Fluctuation analysis from TBT-sensitivity to TBT-resistance in *Dc1M* strain

	Set 1 experiments	Set 2 controls
No. of replicate cultures	96	26
No. of cultures containing the following no. of TBT resistant cells:		
0	65	0
from 1 to 10 ³	5	0
from 10 ³ to 10 ⁴	7	0
from 10 ⁴ to 10 ⁵	8	26
more than 10 ⁵	11	0
Fluctuation		yes
μ (mutants per cell per generation)		7.071 × 10 ⁻⁸

The estimated mutation rate (μ) from TBT-sensitivity to TBT-resistance in *Dc1M* strain was 7.07 × 10⁻⁸ mutants per cell per cell

division. The Malthusian parameter of fitness of TBT-resistant mutants and wild type sensitive cells (0.085 and 0.24 respectively) were used to estimate the coefficient of selection of TBT-resistant mutants (s). By using the values of m and s , the frequency (q) of resistant alleles was estimated in *circa* 3 TBT-resistant mutants per 10^{-4} wild type sensitive cells.

3.4. Growth of TBT-sensitive and TBT-resistant cells on antifouling paint

When wild type sensitive *Dc1M* cells were grown during 15 days on antifouling paint in Nunclon wells-dish plates a massive destruction of cells was observed. Antifouling paint totally inhibited the cell growth and most of the cells were destroyed (initial no. = 5.0×10^5 cells ml^{-1} ; final no. = 1.6×10^5 cells ml^{-1}). In contrast TBT-resistant mutants were able to grow directly on antifouling paint (initial no. = 5.0×10^5 cells ml^{-1} ; final no. = 1.5×10^6 cells ml^{-1}).

4. DISCUSSION

Numerous microalgae were found in the biofouling recovering the underwater body of ships. As expected pennate diatom species, which can easily be attached to surfaces by mucilage secretions (25) are very numerous. Also benthic dinoflagellates are abundant in the ships biofouling. Obviously, early stages of macroalgae easily colonize biofouling.

A lot of resting stages of phytoplankton (cysts and spores) were found in the biofouling. These resting phases seems to be especially well adapted to survive in the biofouling. Since most phytoplanktonic organisms has spores and resting cysts that serve as a perennation function (25), i.e. they allow phytoplankton to survive periods that are not suitable for growth and afterwards germinate when conditions improve, biofouling is a potential source for microalgae dispersion.

Apparently, several species detected on ships biofouling could be exotic species. Taken in account that different families of clones

maintained by asexual growth constitute the population genetic structure of many phytoplankton species (26), also exotic genotypes could arrive to far regions via biofouling. Some of these non-indigenous introduced species or genotypes could proliferate in remote areas and become invasive species.

Long-distance transport of toxin-producing microalgae it is particularly worrisome. Three harmful microalgae species (*Prorocentrum lima*, *Pseudonitzschia pungens* and *Crysochromulina polylepis* implicated in DSP, ASP and mass mortalities of fish respectively) were detected in a small area (less of 3 cm²) of biofouling in one boat. This provides robust evidence on the magnitude of biofouling-associated transport problem. During the 1950s Margalef (one of the best phytoplankton taxonomists) analyzed the microalgae species composition in the Ría de Vigo, NW of Spain, (27-29) providing extensive list of phytoplankton species composition. However, Margalef never detected several microalgae species that constitutes the main problem of harmful algal blooms (HABs) in the Ría de Vigo nowadays. Could have arrived recently these algae to Ría of Vigo via ships biofouling? Since Ría of Vigo with other Rías of NW of Spain (i.e. Pontevedra, Arosa, Muros and Lorbé) is the most important area for shellfish aquaculture in European Union (i.e. mussels, cockles, oysters, clams and scallops) the economic impact of HABs species introduction of could be enormous.

The key to explain microalgae species transport via ships biofouling is know the mechanisms that allow to these species to survive long time attached to antifouling paint. Apparently, adaptation to biofouling paints is not easy. Growth and photosynthetic performance of the experimental strain *Dc1M* was irreversibly inhibited by TBT concentrations many times lower than those used in antifouling paints. Antifouling paint on the bottom of Nunclon wells-dish plates rapidly destroyed wild type *Dc1M* cells. Since adaptation to antifouling paints seems to be difficult, the classic evolutionary point of view assumes that genetic adaptation at such extreme conditions is a gradual process (reviewed in 30).

In contrast, here we propose an alternative explanation for adaptation of microalgae to antifouling paints. When the experimental strain *Dc1M* was cultured in TBT, usually cultures show massive destruction of the sensitive cells by the toxic effect of TBT. However,

after further incubation for 60 days, some cultures became increased in density again, due to the growth of cells that were resistant to the toxic effect of TBT.

The approach for understanding adaptation of microalgae to TBT is to analyze the rare variants that proliferate after the massive destruction of the sensitive cells by this selective agent. Fluctuation analysis is the appropriate procedure to discriminate between TBT-resistant cells arising by rare spontaneous mutations occurring randomly during replication of organisms prior to exposure to TBT and TBT-resistant cells arising through specifically acquired adaptation induced by TBT (reviewed in 31).

Genetic adaptation by rare spontaneous mutation is the mechanism allowing adaptation of microalgae to TBT contamination. The large fluctuation in number of resistant cells detected in the set 1 experiment in contrast to the scarce fluctuation in set 2 controls, unequivocally demonstrates that these resistant cells arose by rare spontaneous single mutations (which mainly occur prior to TBT exposure) and not through direct and specific adaptation in response to TBT. Results of fluctuation suggest that only one gene is implicated in the TBT-resistance process. If several genes are involved in TBT resistance then we should be unable to detect TBT-resistant cells growing in flasks of set 1 experiment because the scarce probability of occurrence for several mutations at the same time. Consequently, microalgae can adapt to antifouling paints much more rapidly by single mutations than if the ability to survive requires multiple mutations. Several evidences suggest that single spontaneous mutation at one locus can achieve adaptation of mesophile microalgae to other severe anthropogenic contaminants including antibiotics (32, 33), herbicides (34-36) other potent biocides (37), and crude oil (38, 39). Even, microalgae are able to rapid adaptation to heavy metals (which are the toxic compounds of antifouling paints) by means of single pre-selective mutations (40-43). Resistant mutants of microalgae are usually used to manufacture specific biosensors (44, 45). This capability is perhaps a consequence of microalgae ability for adaptation to hostile natural environments by mechanisms based on single mutations (46-50).

The *DcM1* strain was widely used to measure mutation rates from sensitivity to resistance to several anthropogenic and natural

contaminants (summarized in Table 2). A remarkable feature was that mutation rate from TBT-sensitivity to TBT-resistance ($\mu = 7.07 \times 10^{-8}$ mutants per cell per cell division) was two or three orders of magnitude lower than those we have described for resistance to other biocides in *Dc1M* strain. It may be that the acquisition of TBT-resistance exemplified by the present work is intrinsically more rare than other kinds of mutation. However, this aspect remains to be investigated.

Table 2. Mutation rates (μ) in mutants per cell division of *Dc1M* strain from sensibility to resistance against different lethal anthropogenic and natural contaminants

Selective agent	μ	source
TBT	7.07×10^{-8}	this paper
DCMU	2.1×10^{-6}	Costas <i>et al.</i> (2001) (34)
TNT	1.4×10^{-5}	García-Villada <i>et al.</i> (2002) (37)
Formaldehyde	3.6×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008c)
Tinto River	1.4×10^{-6}	Costas <i>et al.</i> (2007) (49)
Geothermal waters	1.4×10^{-6} to 1.5×10^{-5}	Costas <i>et al.</i> (2008) (47)
Mynydd Parys pond	1.6×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008a) (43)
Aguas Agrias stream	1.1×10^{-6}	López-Rodas <i>et al.</i> (2008b) (48)
Vulcano Island pond	4.7×10^{-7}	López-Rodas <i>et al.</i> (2009) (46)

Mutation from TBT-sensitivity to TBT-resistance occurs recurrently. However, TBT-resistant cells have diminished fitness compared to wild type TBT-sensitive cells. Consequently, the balance between the recurrent appearance of mutants by rare pre-selective mutation and their elimination by natural selection controls the presence of TBT-resistant cells in the populations. As a result, an equilibrium frequency of around 3 TBT-resistant mutants per each 10^{-4} wild type sensitive cells should maintain in *Dc1M* algal populations non-exposed to TBT. Taking into account both the relatively high number of resistance-mutants and the countless cells comprising algal populations, it could be hypothesized that algal colonization of antifouling paints should be almost instantaneous because TBT-resistant cells are always present in microalgae

populations. The experiment of colonization of Nunclon wells-dish plates painted with antifouling demonstrates validity of this hypothesis.

Long-distances navigation is a characteristic of human civilizations. A lot of microalgae stowaways invade the underwater body of our ships to disperse worldwide. Since microalgal toxins are among the most important emerging health risk due to shellfish consumption (51-53) introduced toxic microalgal species are an important menace.

5. CONCLUSION

1. Marine ecosystems are specially affected by toxin-producing introduced species of microalgae with devastating impacts on aquaculture, fishery, tourism and public health (economic cost estimated in \$ billions). Although ships ballast water has been considered the major vector in dispersion of microalgae, numerous species of microalgae travel great distances forming the biofouling attached the underwater body of ships.
2. In spite of toxic antifouling paints recovering the bottom of ships microalgal species are resistant to these antifouling.
3. Antifouling paint-resistant microalgae arose by rare mutation, which occurs spontaneously in natural populations prior to antifouling paint exposure. The balance between the recurrent appearance of antifouling-resistant mutants and their elimination by natural selection controls the presence of antifouling-resistant cells in the natural populations. An equilibrium frequency estimated in around 3 antifouling resistant mutants per each 10^{-4} sensitive cells should assure a rapid microalgal colonization of the underwater body of ships.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are given to Carmen Romero by micrographs and Lara de Miguel by technical support. Supported by Grants CTM2008-05680-C02-02 and CGL2008-00652/BOS (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

7. REFERENCES

1. Myers, N. & Knoll, A. H. (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98: 5471-5476.
2. Pimentel, D.; Zuniga, R. & Morrison, D. (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econom.* 52: 273-288.
3. Naylor, R. L.; Williams, S. L. & Strong, D. R. (2001) Aquaculture-a gateway for exotic species. *Science*. 294: 1655-1656.
4. Bellan-Santini, D.; Arnaud P. M.; Bellan, G. & Verlaque, M. (1996) The influence of the introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia*, on the biodiversity of the Mediterranean marine biota. *J. Marine Biological Association of the United Kingdom*. 76(1): 235-237.
5. Meinesz, A. (1999) *Killer Algae: A True Tale of Biological Invasion*. Univ. Chicago Press. 360 pp.
6. Subba Rao, D. V.; Sprules, W. G.; Locke, A. & Carlton, J. T. (1994) Exotic phytoplankton from ships' ballast water treatment system: Risk of potential spread to mariculture sites on Canada's East Coast. *Canadian Data Report of fisheries and Aquatic Sciences*. 937: 51.
7. Hallegraeef, G. M. (1998) Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168: 297-309.
8. Keun-Hyung, C. (2009) Risk assessment of ballasted water-mediated invasion of phytoplankton: a modelling study. *Ocean Sci. J.* 44: 221-226.
9. Hallegraeef, G. M. & Bolch, C. J. (1991) Transport of toxic dinoflagellates cysts via ships' ballast water. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 27-30.
10. Gollasch, S.; Dammer, M.; Lenz, J. & Andres, H. G. (2000) Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from Indian Ocean to the North Sea. *J. Plankton Res.* 22: 923-937.
11. Rigby, G. (2001) Ocean Exchange as a means of mitigating the risk of translocating ballast water organisms – A review of progress ten years down the line. *J. Mar. Environ. Eng.* 6: 153-173.
12. Dickman, M. & Zhang, F. (1999) Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 2. Effects of vessel type in the transport of diatoms and dinoflagellates from Manzanillo, Mexico to Hong Kong, China. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 17: 253-262.
13. Drake, L. A.; Ruiz, G. M.; Galil, B. S.; Mullady, T. L.; Friedman, D. O. & Dobs, F. C. (2002) Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233: 13-20.
14. Fahnenstiel, G.; Hong, Y.; Millie, D.; Doblin, M.; Johengen, T. & Reid, D. (2009) Marine dinoflagellate cyst in the ballast tank sediments of ships entering the Laurentian Great Lakes. *Verh Internat. Verein Limnol.* 30: 1035-1038.
15. Sutherland, T. F.; Levings, C. D.; Elliott, C. C. & Hesse, W. W. (2001) Effect of ballast water treatment system on survivorship of natural populations of marine plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210: 139-148.

16. Gregg, M. D. & Hallegraef, G. M. (2007) Efficacy of three commercially available ballast water biocides against vegetative microalgae dinoflagellates cyst and bacteria. *Harmful Algae*. 6: 567-584.
17. Lewis, V. (1989) Principles of Naval Architecture (2nd Rev.) Vol. 1. *Society of Naval Architects and Marine Engineers*. ISBN 09-397-7300-7.
18. Bennett, R. F. (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: Mora, S. J. Editor. Tributyltin: Case study of an environmental contaminant. *Cambridge University Press*. Cambridge, pp. 21-61.
19. Champ, M. A. (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related cost and benefits. *Sci. Total Environ*. 258: 21-71.
20. Omae, I. (2003) Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl. Organomet. Chem*. 17: 81-105.
21. Crow, J. F. & Kimura, M. (1970) An Introduction to Population Genetics Theory. In *Harper and Row* (ed) New York, NY, USA.
22. Schreiber, U.; Schliwa, U. & Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res*. 10: 51-62.
23. Luria, S. E. & Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28: 491-511.
24. Kimura, M. & Maruyama, T. (1966) The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*. 54: 1337-1351.
25. Graham, L. E. & Willcox, L. E. (2000) *Algae*. Prentice Hall. New Jersey. 640 pp.
26. Costas, E. (1990) Genetic variability in growth rates in marine Dinoflagellates. *Genetica*. 83: 99-102.
27. Margalef, R. (1956) Estructura y dinámica de la «purga de mar» en la Ría de Vigo. *Inv. Pesq*. 5: 113-134.
28. Margalef, R.; Durán, M. & Sáiz, F. (1955) El fitoplancton de la ría de Vigo de enero a marzo de 1954. *Inv. Pesq*. 2: 85-129.
29. Durán, M.; Sáiz, F.; López-Benito, M. & Margalef, R. (1956) El fitoplancton de la Ría de Vigo de abril de 1954 a junio de 1955. *Inv. Pesq*. 4: 67-95.
30. Gould S. J. (2002) *The structure of evolutionary theory*. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. 1433 pp.
31. Sniegowski, P. D. (2005) Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*. 166: 360-362.
32. López-Rodas, V.; Agrelo, M.; Carrillo, E.; Ferrero, L.; Larrauri, A.; Martín-Otero, L. & Costas, E. (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol*. 36: 179-190.
33. Sánchez-Fortún, S.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E. & López-Rodas, V. (2009) Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic vs. physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicol*. 18: 481-487.
34. Costas, E.; Carrillo, E.; Ferrero, L. M.; Agrelo, M.; García-Villada, L.; Juste, J. & López-Rodas, V. (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyos-*

- phaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*. 40: 391-398.
35. López-Rodas, V.; Flores-Moya, A.; Maneiro, E.; Perdigones, N.; Marva, F.; García, M. E. & Costas, E. (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evol. Ecol.* 21: 535-547.
 36. Marvá, F.; López-Rodas, V.; Rouco, M.; Navarro, M.; Toro, F. J.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2010) Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicol.* 26: 130-134.
 37. García-Villada, L.; López-Rodas, V.; Bañares, E.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *J. Phycol.* 38: 1074-1081.
 38. López-Rodas, V.; Carrera-Martínez, D.; Salgado, E.; Mateos-Sanz, A.; Báez, J. C. & Costas, E. (2009) A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Rio Negro, Argentina. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 75: 883-899.
 39. Carrera-Martínez, D.; Mateos-Sanz, A.; López-Rodas, V. & Costas, E. (2010) Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicol.* 97: 151-159.
 40. Baos, R.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; López Rodas, V.; Hiraldo, F. & Costas, E. (2002) Short-Term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analising the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37: 593-600.
 41. García-Villada, L.; Rico, M.; Altamirano, M.; Sánchez, L.; López-Rodas, V. & Costas E. (2004) Ocuurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Res.* 38: 2207-2213.
 42. Sánchez-Fortún, S.; López-Rodas, V.; Navarro, M.; Marvá, F.; D'Ors, A.; Rouco, M.; Haigh-Florez, D. & Costas, E. (2009) Toxicity and adaptation of *Dyctiosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1901-1905.
 43. López-Rodas, V.; Marvá, F.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008) Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environ. Exp. Bot.* 61: 43-48.
 44. Altamirano, M.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; Sánchez, L.; Martín-Otero, L.; Flores-Moya, A.; López Rodas, V. & Costas, E. (2004) A novel approach to improve specificity of algal biosensor using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics.* 19: 1319-1323.

45. Peña, E.; Maneiro, E.; Pérez, C.; Moreno, M. C. & Costas, E. (2009) Microalgae fiber optic biosensor for herbicide monitoring using sol gel technology. *Biosensor and Bioelectronics*. 24: 3538-3543.
46. López-Rodas, V.; Perdigones, N.; Marvá, F.; Maneiro, E.; Rouco, M.; Delgado, A.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2009) Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressfull geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. *Phycol. Res.* 57: 111-117.
47. Costas, E.; Flores-Moya, A. & López-Rodas, V. (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows «Noah's Arks» for photosynthesizers during the Neoproterozoic «snowball Earth»? *New Phytol.* 189: 922-932.
48. López-Rodas, V.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*. 72: 703-707.
49. Costas, E.; Flores-Moya, A.; Perdigones, N.; Maneiro, E.; Blanco, J. L.; García, M. E. & López-Rodas, V. (2007) How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytol.* 175: 334-339.
50. Flores-Moya, A.; Costas, E.; Bañares-España, E.; García-Villada, L.; Altamirano, M. & López-Rodas, V. (2005) Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations. *New Phytol.* 166: 655-661.
51. López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Martínez, J.; Navarro, M. & Costas, E. (2006) Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic sellfish poisoning and colorectal cancer. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 72: 391-408.
52. Maneiro, E.; López-Rodas, V.; Costas, E. & Martínez, J. (2008) Shellfish consumption: a major risk factor for colorectal cancer. *Medical Hypotheses*. 70: 409-412.
53. Martínez-Hernández, J.; López-Rodas, V. & Costas, E. (2009) Emerging Health Risk Due to Shellfish Consumption (Charpeher IX, pp. 157-166). In: *Fish Consumption and Health*. Gagne, G. P. & Mediano, R. H. Editors. Nova Science Publisher, Inc New York. 209 ISBN: 978-1-60741-151-2.

*** Información de contacto:**

Dr. Eduardo Costas.

Departamento de Genética (Producción Animal).

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

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

E-mail: ecostas@vet.ucm.es

ARTÍCULO

Estudio comparativo de medidas de composición corporal por absorciometría dual de rayos X, bioimpedancia y pliegues cutáneos en mujeres

María Hernández Ruiz de Eguilaz, Blanca Martínez de Morentín, Salomé Pérez-Diez, Santiago Navas-Carretero, J. Alfredo Martínez *

Unidad Metabólica, Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra.
Recibido el 7 de enero de 2010.

RESUMEN

Las medidas de composición corporal son herramientas normalmente empleadas para el diagnóstico y seguimiento de la obesidad. En el presente trabajo se estudiaron las diferencias entre el índice de masa corporal (IMC), contenido de grasa medido por pliegues cutáneos (PT), impedancia bioeléctrica (BIA) y absorciometría dual de rayos-X (DEXA), como métodos de medida de composición corporal en mujeres adultas ($n = 91$). Aunque la estimación de grasa corporal entre los métodos fue diferente, la correlación entre las medidas de composición corporal fue positiva (IMC-BIA, DEXA, PT: 0,902, 0,780, 0,722, respectivamente; BIA-DEXA, PT: 0,794 y 0,674 respectivamente; DEXA-PT: 0,787, todas las correlaciones $p < 0,001$) y estadísticamente significativa. En cuanto a la concordancia entre métodos para clasificar individuos en normopeso o sobrepeso, fue en general baja, excepto en el caso del índice de masa corporal con la bioimpedancia, que fue buena, y el índice de masa corporal con la medida del pliegue tricipital, que fue aceptable. En conclu-

sión, los resultados de este estudio apuntan a que la medida del contenido de grasa puede ser diferente en función del método de estimación empleado, pero la buena correlación entre ellos permite comparar la evolución del contenido de grasa durante una intervención dietética, siempre y cuando se tome como referencia el mismo aparato para un mismo individuo.

Palabras clave: Antropometría y Composición corporal; Absorciometría dual de Rayos X; Bioimpedancia; Pliegues cutáneos; Índice de Masa Corporal.

ABSTRACT

Comparative study of body composition measures by dual X-ray absorptiometry, bioimpedance and skinfolds in women

Body composition assessments are important measurements for the diagnosis and monitoring of obesity. The present study compared the body mass index (IMC) with body fat content estimated by skinfold (PT), bioelectric impedance (BIA) and dual X-ray absorptiometry (DEXA) in adult women ($n = 91$). Although body fat estimations between methods differed, correlation between the various body composition methods was positive and statistically significant (IMC-BIA, DEXA, PT: 0.902, 0.780, 0.722, respectively; BIA-DEXA, PT: 0.794 y 0.674 respectively; DEXA-PT: 0.787, all correlations $p < 0.001$). In relation to concordance indexes between measurements to classify individuals in normo- or overweight, it was globally low, with the exception of the concordance between body mass index with bioimpedance, which was good, and body mass index with triceps skinfold, which was acceptable. In conclusion, the outcomes obtained in the present study suggest that body fat content estimation can be very different depending on the method employed but the good correlation existing between methods permits to compare body fat content evolution during a dietary intervention, if the analysis is always performed by the same method in the same individual.

Keywords: Anthropometry and body composition; Dual X-ray Absorptiometry; Bioimpedance; Skinfolds; Body Mass Index.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, que se define por la presencia de un exceso de grasa corporal debido a un balance energético positivo mantenido a lo largo del tiempo (1). Esta enfermedad provoca un empeoramiento del estado de salud, por sí misma y por estar asociada a un mayor riesgo de padecer diabetes, enfermedad cardiovascular y algunos tipos de cáncer (1, 2).

La prevalencia de esta enfermedad se sitúa en torno al 15,35% de la población adulta española, siendo más frecuente en mujeres (17,5%) que en hombres (13,2%), y aumentando su incidencia a medida que avanza la edad (2). Ante estos datos, es fundamental el desarrollo de estrategias tanto preventivas como terapéuticas para combatir esta situación de pandemia. El enfoque del tratamiento debe ser multidisciplinar, y considera actualmente como objetivos tanto el cambio de hábitos dietéticos como el incremento de la actividad física. Una de las principales medidas del éxito de las intervenciones nutricionales es el estudio de los cambios en la composición corporal, además de las determinaciones bioquímicas y otros indicadores de riesgo de padecer enfermedades asociadas a la obesidad (1).

El diagnóstico y seguimiento de la obesidad requieren apropiados métodos de medida de la grasa corporal (3). A la hora de estudiar los cambios en la composición corporal tras una intervención dietética, en investigación se busca el uso de métodos sensibles, con una variabilidad entre medidas mínima y que sean comparables con otros sistemas de medida (4).

El método más utilizado para definir y clasificar la obesidad en el adulto es el Índice de Masa Corporal (IMC): peso (kg)/talla² (m). Este parámetro se correlaciona con el porcentaje de grasa corporal, aunque tiende a sobreestimar en sujetos con elevada masa muscular, como por ejemplo deportistas, y a subestimar en sujetos con baja masa magra como pueden ser los ancianos (1). En función del porcentaje de grasa corporal, se considera que un individuo presenta obesidad cuando tiene un valor por encima del 20% en hombres y del 30% en mujeres adultas (2).

Existen otros métodos para el estudio de la composición corporal, siendo uno de los más habituales la medida de los pliegues

cutáneos, que es un método indirecto de estimación de la grasa corporal. Uno de los principales inconvenientes de la medida de pliegues cutáneos es la variabilidad de la medida según el profesional que la realice, además de existir dificultad para coger grandes pliegues e incluso la insuficiente apertura del plicómetro en algunos casos (2, 5). Además, este método mide únicamente la grasa subcutánea y no estima la grasa visceral.

Otros métodos para medir la grasa corporal son la impedancia bioeléctrica (BIA) y la absorciometría dual de rayos X (DEXA), que son técnicas empleadas fundamentalmente en la práctica clínica y también en investigación (6, 7).

Existen diversos estudios de comparación entre los diferentes métodos de medida de composición corporal: bioimpedancia multifrecuencia tetrapolar frente a DEXA (8), bioimpedancia bipolar frente a tetrapolar (4), variabilidad intraindividual de un equipo de bioimpedancia en relación al índice de masa corporal y a la medida del pliegue tricipital (9). Todos estos estudios muestran que existe una buena correlación entre los diversos métodos de composición corporal, sin embargo, aun no se ha definido por completo la fiabilidad de todos ellos, ni se ha llegado a comprobar totalmente si los resultados obtenidos por uno u otro procedimiento, son del todo equiparables (4).

Ante la necesidad de conocer la correlación y la fiabilidad de los diferentes métodos de medida de la composición corporal, el objetivo del presente estudio fue evaluar la correlación en el cálculo del porcentaje de grasa obtenido por diferentes métodos de análisis de la composición corporal: pliegues cutáneos, impedancia bioeléctrica y absorciometría dual de rayos X.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Sujetos

El estudio se llevó a cabo en 91 mujeres con una edad de 34 ± 7 años y un índice de masa corporal (IMC) de $25 \pm 2,9$ kg/m². Todas las voluntarias eran personas sanas, con un peso estable durante los últimos tres meses y no seguían ningún tipo de tratamiento farma-

cológico o dietético que pudiera producir retenciones hídricas y cambios en la composición corporal.

2.2. Diseño del estudio

El diseño del estudio fue de tipo transversal. Los voluntarios fueron citados a primera hora de la mañana en el Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología de la Universidad de Navarra, en condiciones de ayuno de doce horas, con la vejiga vacía y sin haber realizado el día anterior ningún tipo de ejercicio físico intenso, ni haber consumido alcohol.

Todas las medidas antropométricas se realizaron en ropa interior, sin calzado y desprovistos de objetos metálicos. La talla de los voluntarios se midió con una báscula-tallímetro (Seca-220, Seca gmbh & Co., Hamburgo, Alemania) y el peso se determinó con un aparato de bioimpedancia (TANITA SC-330, Tanita Corporation, Tokio, Japón), para calcular posteriormente el IMC: $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m}^2\text{)}$.

El porcentaje de grasa corporal se determinó con ayuda del aparato de impedancia bioeléctrica TANITA SC-330 y mediante el equipo de absorciometría dual de rayos X Lunar iDXA (General Electrics, California, EEUU).

También se midió el pliegue tricipital (PT) en la parte posterior del miembro superior dominante, en el punto medio entre el acromion y el olécranon, siguiendo la técnica de Durnin *et al.* (10). La medida de este pliegue se eligió por ser el método más utilizado como medidor de grasa corporal. La determinación se realizó por triplicado con un plicómetro (Holtein LTD, Pembs, Reino Unido) y posteriormente se calculó la media. La densidad corporal se calculó mediante la ecuación de Durnin y Womersley (10): $\text{Densidad} = 1,1143 - [0,0618 \times \log (\text{pliegue tricipital, cm})]$.

El porcentaje de grasa corporal se calculó a partir de la ecuación de Siri (11), específica para cada grupo de edad en cada sexo: $\% \text{ Grasa Corporal} = [(4,95/\text{densidad}) - 4,5] \times 100$.

2.3. Análisis estadístico

El procesado y el análisis de los datos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS ibérica SLU, Madrid, España).

Las medidas de composición corporal por los diferentes métodos se estudiaron con una prueba *t* para muestras relacionadas. Se estratificó la muestra para normopesos (NP) y sobrepesos (SP), considerando valores inferiores al 33% de grasa o inferiores a 25 kg/m² en el caso del IMC como normopeso, y valores superiores al 33% de grasa y entre 25-30 kg/m² para IMC como sobrepeso (2). También se estratificó la muestra en tres grupos iguales teniendo en cuenta la variable edad y se realizó un análisis *post hoc*.

Para valorar la concordancia entre los diferentes métodos de composición corporal, se clasificó a las voluntarias en normopeso y sobrepeso para cada medida, se realizaron tablas de contingencia y se calculó el índice Kappa. El índice Kappa (test de Cohen) sirve para valorar la concordancia entre dos métodos de recogida de datos. El valor máximo para un índice Kappa es 1, que indica concordancia total. El mínimo puede ser negativo. Puede afirmarse que un índice Kappa es excelente si se sitúa por encima de 0,8, bueno si se sitúa por encima de 0,6 y aceptable si es superior 0,4 (12).

3. RESULTADOS

Las características generales de las participantes en el estudio en cuanto a número de participantes, edad, peso, altura e IMC, se muestran en la Tabla 1.

La Tabla 2 muestra los porcentajes de grasa determinados por los diferentes métodos de medida, tanto para la muestra en general como estratificando en NP y SP.

Según los resultados, se observa que existe una correlación positiva entre las medidas de grasa obtenidas por los diferentes métodos de composición corporal ($p < 0,001$) (Tabla 3).

Tabla 1. Descripción basal de las mujeres estudiadas.

	Total voluntarias	Normopeso según IMC	Sobrepeso según IMC
	(n = 91)	(n = 47)	(n = 44)
Edad	34,8 ± 7,1	32,8 ± 6,6	36,9 ± 7,04
Peso (kg)	66,3 ± 8,04	61,2 ± 6,4	71,7 ± 5,7
Talla (cm)	162,9 ± 6,1	164,2 ± 6,5	161,6 ± 5,3
IMC (kg/m ²)	25 ± 2,9	22,7 ± 1,5	27,5 ± 1,6

IMC: Índice de Masa Corporal.

Tabla 2. Porcentaje grasa según los diferentes métodos de medida.

	Total voluntarias	Normopeso según IMC	Sobrepeso según IMC
	(n = 91)	(n = 47)	(n = 44)
Grasa BIA (%)	31,6 ± 6,04 ^a	27,3 ± 4,7 ^a	36,3 ± 3,2 ^a
Grasa DEXA (%)	38,5 ± 6,04 ^b	34,5 ± 5,2 ^b	42,7 ± 3,5 ^b
Grasa PT (%)	34,5 ± 3,8 ^c	32,1 ± 2,9 ^c	37,1 ± 2,9 ^c

IMC: Índice de grasa corporal; BIA: Bioimpedancia; DEXA: Absorciometría dual de rayos-X; PT: Pliegue Tricipital.

Distintas letras en una columna significa que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estratificando la muestra en función del IMC, en NP y SP, la correlación seguía siendo positiva para todas las medidas ($p < 0,005$ excepto para BIA-PT sobrepeso donde $p = 0,048$) (Tabla 3).

Estratificando la muestra en terciles de grupos de edad (19-32, 33-38 y 39-46 años) y realizando pruebas *post hoc* (DMS y Bonferro-ni), el porcentaje de masa grasa aumenta gradualmente, siendo el contenido de masa grasa en el tercil de edad más alto significativamente superior que el porcentaje de masa grasa del tercil más bajo ($p = 0,001$) (Figura 1).

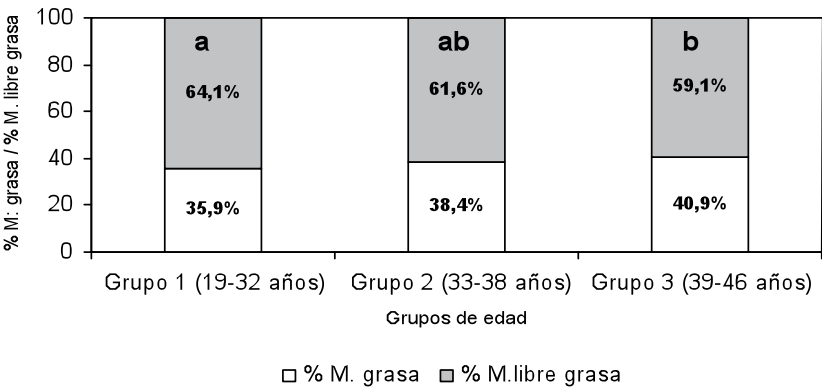
La concordancia entre la medida del porcentaje de grasa determinado por DEXA y el determinado por los otros métodos fue relativamente baja (índice Kappa < 0,4) (12), así como la concordancia entre los valores de grasa determinados por bioimpedancia y los observados por pliegue tricipital.

Sin embargo, existe una buena concordancia entre las medidas determinadas por bioimpedancia y por el IMC (índice Kappa > 0,6) y una concordancia aceptable entre IMC y pliegue tricipital (índice Kappa > 0,4) (12) (Tabla 4).

Tabla 3. Correlaciones entre los diferentes métodos de medida teniendo en cuenta la muestra total y estratificando en NP y SP.

% Grasa	Correlación					
	Muestra total (n = 91)		Normopeso IMC (n = 47)		Sobrepeso IMC (n = 44)	
	Correlación	p	Correlación	p	Correlación	p
IMC-BIA	0,902	< 0,001	0,810	< 0,001	0,720	< 0,001
IMC-DEXA	0,780	< 0,001	0,468	0,001	0,642	< 0,001
IMC-PT	0,722	< 0,001	0,394	0,006	0,441	0,003
BIA-DEXA	0,794	< 0,001	0,526	< 0,001	0,720	< 0,001
BIA-PT	0,674	< 0,001	0,412	0,004	0,299	0,048
DEXA-PT	0,787	< 0,001	0,680	< 0,001	0,540	< 0,001

IMC: Índice de grasa corporal; BIA: Bioimpedancia; DEXA: Absorciometría dual de rayos-X; PT: Pliegue Tricipital.



Diferentes letras = diferencias significativas (p = 0,001).

Figura 1. Porcentajes de composición corporal medidos por DEXA según terciles de edad.

Tabla 4. **Porcentajes de concordancia entre normopeso y sobrepeso según los diferentes sistemas de medida e Índice Kappa.**

		DEXA			BIA			PT				
		NP	SP	Kappa	NP	SP	Kappa	NP	SP	Kappa		
IMC	NP	15,4%	36,3%	0,291	47,3%	7,7%	0,757	33%	18,7%	0,498		
	SP	0%	48,4%		4,4%	40,7%		6,6%	41,8%			
PT	NP	14,3%	25,3%	0,383	31,9%	23,1%	0,397					
	SP	1,1%	59,3%		7,7%	37,4%						
BIA	NP	15,4%	39,6%	0,259								
	SP	0%	45,1%									

IMC: Índice de grasa corporal; BIA: Bioimpedancia; DEXA: Absorciometría dual de rayos-X; PT: Pliegue Tricipital. NP: Normopeso; SP: Sobrepeso.

4. DISCUSIÓN

El estudio de la composición corporal es un aspecto muy importante en la valoración del estado nutricional, ya que la distribución de la masa grasa y la masa magra en un individuo puede ayudar a detectar y corregir problemas nutricionales como la obesidad o la desnutrición (13). A través del estudio de la composición corporal se puede juzgar y valorar de forma indirecta el efecto de la ingesta de energía y los diferentes nutrientes, el crecimiento o la actividad física (5).

La absorciometría dual de rayos X (DEXA), se diseñó inicialmente para el estudio de la masa ósea, pero permite valorar de forma precisa la masa grasa y la masa libre de grasa, irradiando muy levemente al individuo durante unos siete minutos. Aunque su precio es de varios miles de euros, su coste se ha reducido en los últimos años, lo que ha permitido que su uso se difunda con rapidez y que la DEXA se haya convertido en una técnica de referencia (7).

La DEXA estudia la composición corporal desde un punto de vista de tres compartimentos que se distinguen por sus diferentes capacidades de atenuación de los rayos X: masa grasa (MG), masa

ósea (MO) y MLG o masa magra; los componentes óseo y graso presentan la atenuación más alta y más baja, respectivamente, mientras que el componente tisular blando presentaría una atenuación intermedia (6). Con el uso del DEXA se ha mostrado que personas no identificadas por IMC u otros aparatos de medida como no obesas, realmente contienen más de un 25% de grasa en hombres y más de un 33% en mujeres, porcentajes considerados como indicadores de obesidad según la SEEDO y otras organizaciones científicas (7).

Al realizar la comparación entre las mediciones de los diversos aparatos, lo primero que se ha podido observar es que aunque las medidas son distintas según el método, existe una correlación positiva entre ellos. Esta correlación se mantiene tanto en la totalidad de la muestra como cuando se estudian los resultados estratificando la muestra en función del IMC en normopesos y sobrepesos. La importancia de los resultados obtenidos estriba en que se confirma que el método utilizado para determinar la composición corporal de un individuo no es tan importante como el hecho de utilizar siempre el mismo aparato para realizar el seguimiento individualizado. Además, estos datos confirman resultados previos de otros autores que ponen de manifiesto la buena correlación existente entre la medida de la composición corporal por métodos de bioimpedancia y por DEXA (4).

Separando la muestra por grupos de edad, se observa de forma clara, que a medida que los voluntarios presentan una mayor edad, el porcentaje de grasa va aumentando, como era de esperar, ya que la edad se asocia positivamente con el porcentaje de masa grasa del organismo (14).

En este estudio también se analizó la concordancia entre las diferentes mediciones, y comprobar si todas las personas asignadas al grupo de sobrepeso o de normopeso, lo eran con los diferentes aparatos. Tras los resultados obtenidos se observa que el diagnóstico de sobrepeso, según el índice de masa corporal, sólo coincide con el diagnóstico por bioimpedancia y por pliegue tricipital. Además es importante resaltar la baja concordancia entre las medidas por IMC, bioimpedancia y pliegue tricipital respecto a la medida por DEXA, ya que un alto porcentaje de las personas diagnosticadas por cualquiera de los tres métodos como normopeso (menos del 33% de masa grasa o IMC menor de 25), son sobrepesos según el DEXA, al superar el 33% de contenido de masa grasa. Por el contrario, todas las personas que

son consideradas sobrepeso por los tres métodos, también lo son por el DEXA. Según estos resultados, se puede decir que bioimpedancia, IMC y PT tienden a subestimar la grasa en personas que presentan normopeso, lo cual confirma las observaciones de otros autores, que observaron que los métodos de bioimpedancia tienden a subestimar el porcentaje de grasa corporal en personas delgadas y por el contrario, sobreestima la grasa corporal en personas con sobrepeso u obesidad (4). En el Healthy Women's Study (15), las mujeres postmenopáusicas mostraban una buena correlación entre el IMC y el porcentaje de grasa medido por DEXA ($r = 0,81$), pero con una gran variabilidad. Así, para un IMC de 20 a 30 kg/m², se corresponde con un 22-50% de masa grasa; para 30-32 kg/m², con un 42-54%.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que se ha utilizado un método de bioimpedancia bipolar, y existen estudios que muestran que los equipos bipolares dan resultados muy variables en función de la distribución de la grasa en el sujeto analizado, es decir, que dichos resultados varían según la localización de la grasa en el segmento superior o inferior del organismo. En cambio, los analizadores tetrapolares, dado que evalúan simultáneamente ambos segmentos, proporcionan datos más objetivos, independientemente de la localización preferencial de los depósitos grasos (8, 16). Otros autores han comparado la composición corporal de diversos aparatos de bioimpedancia tanto bipolares como tetrapolares (Bodystat, Omron y Tanita) con el DEXA, comprobando que la mayor correlación existe entre el DEXA y el Bodystat, que es un aparato de medida de bioimpedancia tetrapolar (17).

Obviamente, la elección del método de medida va a depender de diversos factores (18), incluyendo la movilidad que necesite el investigador y el objetivo del estudio en cuestión. La correlación entre los métodos estudiados en el presente trabajo permite asegurar que siempre que se utilice el mismo aparato de medida en un mismo individuo, el estudio de la evolución de la composición corporal en el tiempo se puede realizar con cualquiera de estos métodos, pero si se quieren realizar medidas puntuales, o valorar más exhaustivamente un factor en concreto, nuestra selección del aparato de medida puede resultar clave (18).

Una limitación que presenta este estudio es el no haber incluido en la muestra mujeres obesas, lo cual requiere futuros estudios con

tamaños muestrales más amplios y sujetos con normopeso, sobrepeso y obesidad.

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados de nuestro estudio apuntan que, aunque los porcentajes de grasa determinados por los diversos métodos de medida son diferentes, se correlacionan positivamente, por lo que cualquiera de ellos sería útil para valorar la composición corporal, siempre y cuando se tome como referencia el mismo aparato para la realización de las diversas mediciones en un mismo individuo.
2. La buena concordancia entre las medidas de IMC, bioimpedancia y pliegue tricipital, validan la utilidad de estas tres herramientas para la valoración de la composición corporal tanto en clínica como en investigación.
3. Los métodos de bioimpedancia, IMC y PT, tienden a subestimar el diagnóstico de obesidad en personas con normopeso, ya que un elevado porcentaje de las personas que presentan normopeso según estos tres métodos, presentan sobrepeso con DEXA, por lo que la interpretación de los datos en este tipo de personas, deberá ser estudiada de forma más exhaustiva.

En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se requieren más estudios para determinar la posible sobreestimación de sujetos con sobrepeso medidos por DEXA, o la subestimación de sujetos con sobrepeso medidos por otros métodos, así como la definición de los puntos de corte para asignar situaciones de normopeso y sobrepeso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Del Álamo, A. J.; Gonzáles, A. & González, M. (2006) *Obesidad*. 6 (24). Ourense: SAP Novoa Santos.
2. Rubio, M. A.; Salas-Salvadó, J.; Barbany, M.; Moreno, B.; Aranceta, J.; Bellido, D., *et al.* (2007) Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la

- obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Revista Española de Obesidad*, 5(3), 135-175.
3. Russolillo, G.; Astiasarán, I. & Martínez, J. A. (2003) *Valoración nutricional en el paciente obeso*. Intervención dietética en la obesidad (pp. 29-41). Pamplona: EUNSA.
 4. Marrodán, M. D.; Santos, M. G.; Mesa, M. S.; Cabañas, M. D.; González-Montero de Espinosa, M. & Pacheco del Cerro, J. L. (2007) Técnicas analíticas en el estudio de la composición corporal. Antropometría frente a sistemas de bioimpedancia bipolar y tetrapolar. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 27(1): 11-19.
 5. Moreno, B.; Monereo, S., Álvarez, J. (2000) *Obesidad. La epidemia del siglo XXI*. Madrid (2.^a ed.). Ediciones Díaz de Santos, S. A.
 6. Bellido, D. & Carreira, J. (2008) Análisis por absorciometría de rayos X de doble energía y composición corporal. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2(2): 85-108.
 7. Oria, E.; Lafita, J.; Petrina, E. & Argüelles, I. (2002) Composición corporal y obesidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 25: (S1).
 8. Sun, G.; French, C. R.; Martin, G. R.; Younghusband, B.; Green, R. C., Xie, Y. G., *et al.* (2005) Comparison of multifrequency bioelectrical impedance análisis with dual-energy X-ray absorptiometry for assessment of percentage body fat in a large, healthy population. *American Journal Clinical Nutrition*. 81: 74-78.
 9. Pérez, S.; Parra, M. D.; Martínez de Morentin, B. E.; Rodríguez, M. C. & Martínez, J. A. (2005) Evaluación de la variabilidad intraindividual de la medida de composición corporal mediante bioimpedancia en voluntarias sanas y su relación con el índice de masa corporal y el pliegue tricipital. *Enfermería Clínica*. 15(6): 343-347.
 10. Durnin, J. V. G. A. & Womersley, J. (1974) Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *British Journal of Nutrition*. 32: 77-97.
 11. Siri, W. E. (1961) Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods, en Brozek, J. & Henschel, A. (Eds.), *Techniques for measuring body composition* (pp. 223-44). Washington DC: National Academy of Sciences. Natural Resources Council.
 12. Sánchez-Villegas, A.; Faulín-Fajardo, F. & Martínez-González, M. A. (2006) *Bioestadística amigable* (2.^a ed.). España: Díaz de Santos, S. A.
 13. Martínez, J. A. (2004) *Fundamentos Teórico-Prácticos de Nutrición y Dietética*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana.
 14. Horber, F. F.; Gruber, B.; Thomi, F.; Jensen, E. X. & Jaeger, P. (1997) Effect of sex and age on bone mass body composition and fuel metabolism in humans. *Nutrition*. 13: 524-534.
 15. Kuller, L. H. (2001) Epidemiología de la obesidad en los adultos en relación con la enfermedad cardiovascular, en *Obesidad: impacto en la enfermedad cardiovascular*. Fletcher, G. F.; Gruñid, S. M. & Hayman, L. (Eds.), American Heart Association (324). Barcelona: Futura Publishing Company (Ed. Española, Medical Trends).

16. Santos, M. G.; Marrodan, M. D.; Mesa, M. S.; Cabañas, M. D.; González-Montero de Espinosa, M. & Pacheco, J. L. (2008) Análisis de la composición corporal mediante BIA tetrapolar y bipolar en población juvenil española, en Nieto Amada, J. L.; Obón Nogués, J. A. & Baena Pinilla, S. (Eds.), *Genes, ambiente y enfermedades en poblaciones humanas* (pp. 639-648). Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza.
17. Verovská, R.; Lacná, Z.; Haluzíková, D.; Fábín, P.; Hájek, P.; Horák, L., *et al.* (2009) *Comparison of various methods of body fat analysis in overweight and obese women*. III interni klinika 1. lékařské fakulty. *UK a VFN Praha*. 55(5): 455-461.
18. Duren, D. L.; Sherwood, R. J.; Czerwinski, S. A.; Lee, M.; Choh, A. C.; Siervogel, R. M. & Cameron Chumlea, W. (2008) Body composition methods: comparison and interpretation. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2: 1139-1146.

*** Información de contacto:**

Dr. J. Alfredo Martínez.

Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología.

Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

C/ Irunlarrea, 1. 31008, Pamplona. Navarra.

E-mail: jalfmtz@unav.es

Prediction of ligand binding energy and anti-inflammatory effect of flavonoids in the glucocorticoid receptor by molecular dynamics simulations and linear interaction energy method

Álvaro Cortés Cabrera*, Cristina Rueda Pérez

Unidad de Bioinformática.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM.

Recibido el 23 de marzo de 2010.

ABSTRACT

Flavonoids are compounds composed of a three-ring structure with various substitutions formed in plants, from aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, to participate in the light-dependent phase of photosynthesis catalyzing electron transport. Their anti-inflammatory properties are of special interest as adverse reactions in humans appear to be rare. For this reason the aim of this work is to try to explain the binding mode of flavonoids and to estimate the binding energy of the compounds to glucocorticoids receptor using the LIE method. Fifteen flavonoids were used to correlate calculated binding energy with experimental values. The squared correlation coefficient achieved is significant ($R^2 = 0.74$ and $p = 0.000$) and good description of the binding mode was obtained. Three hydrogen binding zones were identified corresponding to aminoacids Arg81-Gln40, Thr205-Gln111 and Leu33-Asn34. The interaction with the first zone was found related with lower values of energy of binding with statistically significance of 95%.

Keywords: Molecular dynamics; Docking; Glucocorticoids Receptor; Flavonoids.

RESUMEN

Predicción de la energía de unión y efecto antiinflamatorio de flavonoides sobre el receptor de glucocorticoides mediante simulaciones de dinámica molecular y el método linear de energía de interacción

Los flavonoides son compuestos formados por tres anillos con varias sustituciones sintetizados en vegetales de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina para participar en la fase luz-dependiente de la fotosíntesis transportando electrones. Sus propiedades antiinflamatorias son de especial interés debido a que las reacciones adversas que estos producen en humanos son raras. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo es explicar el modo de unión de estas moléculas y estimar la energía de unión al receptor de glucocorticoides utilizando el método LIE. Se utilizaron 15 flavonoides para correlacionar sus energías de unión estimadas con las experimentales. El coeficiente de correlación alcanzado fue significativo ($R^2 = 0,74$ y $p = 0,000$) y se obtuvo una buena descripción del modelo. Se encontraron tres zonas de unión por puente de hidrógeno correspondiendo a los aminoácidos Arg81-Gln40, Thr205-Gln111 and Leu33-Asn34. La primera zona se pudo correlacionar con menores valores de energía con una confianza del 95%.

Palabras clave: Dinámica molecular; Docking; Receptor glucocorticoides; Flavonoides.

1. INTRODUCTION

Flavonoids are compounds of low molecular weight, derived from the secondary metabolism of a wide range of plants. Flavonoids are composed of a three-ring structure with various substitutions and are formed in plants, from aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, to participate in the light-depend phase of photosynthesis catalyzing electron transport. In plants, they are usually found

as glycosylated or sulfated derivatives and only as phenolic acid derivatives after biotransformation in the intestine conducted by microorganism. Their antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective activities are described extensively in literature and are known since ancient times. Anti-inflammatory properties are of special interest as adverse reactions in humans appear to be rare, even with a daily exposure to flavonoids-containing food.

Several mechanisms are suggested for anti-inflammatory effects of flavonoids. One of the most proved and complex mechanisms, implicates an inhibition in the release of inflammatory molecules such histamine, tryptase, IL-6, IL-8 and TNF- α , from activated mast cells through a phosphorylation of M α CDONIA (Mast Cell Degranulation Inhibitor Agent) protein, involved in exocytosis (1). The underlying mechanism of this action is based on an activation of protein kinase C (PKC) calcium-independent and an inhibition of other PKC enzymes and tyrosin-kinases that play a major role in the inflammatory response.

Another mechanism proposed to justify the anti-inflammatory activity, suggests an inhibition of enzymes of the cyclooxygenase (COX) family, which produces the transformation of arachidonic acid into proinflammatory prostaglandins, competitively (2) or decreasing its transcription (3).

However, in a recent work, Nishizaki *et al.* (4) reported that flavonoids are powerful agonist of glucocorticoid receptors. Glucocorticoids bind the nuclear receptor, accelerating the transcription of genes that codify for proteins like lipocortin-1 which strongly inhibits the effect of phospholipase-2 that provides arachidonic acid which is the substrate of COX. Thus, an indirect anti-inflammatory effect can be expected by the interaction of flavonoids with the glucocorticoid receptor (GR).

In the light of the diversity of plants with anti-inflammatory effect mediated by flavonoids (5), it is of great value to develop a method to predict the binding affinity to GR. For this reason the aim of this work is to try to explain the binding mode of flavonoids and to estimate the binding energy of the compounds based on experimental values from gene expression assays and the linear interaction energy (LIE) approximation (6).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ligands/Enzyme models

To achieve a reliable model, the structures of the ligands (Table 1) were energy minimized, in first place using the MM2 force field, and afterwards with the semi-empirical Hamiltonian AM1 (Austin Model 1), as implemented in MOPAC 7.1. The structures resulting from this procedure were used as the starting point of docking assays.

The atomic model of GR from X-ray diffraction studies was obtained from Brookhaven Protein Data Bank (PDB code: 1M2Z). Following, the ligand binding domain (residues from 521 to 777) was extracted discarding all crystallographic water and the ligand (dexamethasone). To avoid the high energy interactions present in the crystal structure, a two parts energy minimization protocol was carried out. In the first part, the structure was minimized by 400 steps of steepest descents (SD), carefully observing the root mean square deviation (RMSD) from the initial crystallographic positions to avoid distortion of the structure. In the last part, 1500 steps of Polak-Ribiere conjugate gradient (GC) were applied with the same considerations about distortion of the structure. This protocol was carried out using the GROMOS 96 43a1 force field and the suite GROMACS 4.0.3.

2.2. Docking

All docking studies were carried out by the program Autodock4 (7) version 4.0.3 which allows a very fast energy evaluation using precomputed grids of affinity potentials for rigid docking. In order to explore the conformational space of the ligands, all torsional bonds in substrates were set free to perform flexible docking while the enzyme was kept rigid. Polar hydrogens and Gasteiger charges were assigned by the respective modules in Autodock Tools (7).

With every ligand, we developed a rigid docking assay with a grid box of 40 amstrong × 40 amstrong × 40 amstrong placed at the crystallographic coordinates of the ligand with a spacing of 0.375 amstrong between points, assuring coverage over the active center.

All the grid maps used to represent the protein in the rigid docking were calculated by AutoGrid.

Finally, the empirical free energy function and the Lamarckian genetic algorithm were used, applying a standard protocol with an initial population of 150 randomly placed individuals, a maximum number of 2.4×10^7 energy evaluations, a mutation rate of 0.02, a crossover rate of 0.80, and an elitism value of 1.

The results were clustered according to a RMSD criterion and were classified taking the predicted energy of binding into account. In all cases the most favorable conformations were selected according to the following criteria: best energy and best superimposition with the crystallographic ligand. Suitable conformations were used in molecular dynamic studies for assessing the stability and the energy of the complex.

2.3. Molecular dynamics

The complexes ligand-enzyme were evaluated in molecular dynamics simulation. All the topological parameters for the enzyme were created by GROMACS programs and the parameters of ligands were built by the Dundee PRODRG Beta Server (8). The complexes were solvated in a box of SPC/E water, neutralized with sodium ions and then energy minimized by a two-steps protocol as described before for the enzyme.

Following the minimization, a simulation of 300 ps at 298K and 1 atm with pressure coupling using Parrinello-Rahman method (9) was performed using the leapfrog algorithm (isobaric-isotherm, NPT assemble and periodic boundary conditions) with constraints in all bonds using LINCS algorithm (10). Particle-Mesh-Ewald (PME) summation was applied dealing with long-range electrostatics (11) and a 10 amstrong cut-off for van der Waals interactions was used. Energy and coordinates were recorded each picosecond to estimate the energy contribution and the possible interactions between ligand and the protein.

2.4. Linear interaction energy

The LIE method is based on the assumption that ΔG of the system depends linearly on changes in the van der Waals and electrostatic components. This is supported by observations that the free energy of solvation on non-polar moieties often scale linearly with respect to variables characterizing the size of the solute (12).

To perform the binding energy estimation for every complex, we used this approach. LIE method evaluates separately the electrostatic and van der Waals interaction energies of the ligand in bound and free states. For this purpose, we carried out new molecular dynamics simulations of all ligands in water to measure the coulombic and van der Waals contributions of the free ligands with identical protocol and considerations to the complex dynamics.

The approximated binding energy is obtained as it is shown:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha(\langle E^{\text{vdw}} \rangle_{\text{complex}} - \langle E^{\text{vdw}} \rangle_{\text{free}}) + \beta(\langle E^{\text{qq}} \rangle_{\text{complex}} - \langle E^{\text{qq}} \rangle_{\text{free}})$$

where $\langle E^{\text{vdw}} \rangle_{\text{complex}}$ and $\langle E^{\text{vdw}} \rangle_{\text{free}}$ denote the average van der Waals interaction energies in the bound and free forms, and $\langle E^{\text{qq}} \rangle_{\text{complex}}$ and $\langle E^{\text{qq}} \rangle_{\text{free}}$ denote the average electrostatic interaction energies in the bound and free forms. The value of α , strongly depends on the system, the force field and the computational methods applied. For this reason, a proper value should be determined by comparing the experimental and calculated binding energies. In addition, β value was originally fixed to 0.5, however the study of solvation energies of various small substrates showed that β decreases with the number polar groups like hydroxyl so a consideration to this point have to be done.

Training set to determine the values of α and β , was composed with dexamethasone, betamethasone and cortisol, all well known GR ligands with Kd (constant of dissociation) experimentally measured (Table 2). Exactly the same protocol for flavonoids was followed for the three training compounds and 300 ps bound and free simulations were carried out for each ligand.

To obtain binding energy values for the compounds in the training set, we applied the equation:

$$\Delta G_{\text{bind}} = -RT \ln Kd$$

where R is the gas constant, T is temperature (Kelvin) and K_d is the dissociation constant. The calculated ΔG_{bind} values were obtained by the LIE approximation using the energy contributions retrieved from MD trajectories of free and bound ligand and were used in a linear regression test to determinate if they are statistically related with the experimental ΔG_{bind} using the GNU/PSPP 0.6.1 program (13).

The use of PME (Particle-Mesh-Ewald) dealing with the long range electrostatic interactions was specially considered as in LIE method only short-range contributions are taking into account. The results of the test yield in a very low energy contribution of the PME to the total electrostatic energy so all effects of periodic boundary conditions and PME can be neglected for the low size of the system.

3. RESULTS

3.1. Docking

In a first approach, dexamethasone was evaluated in a docking assay to determine if the protocol was able to predict the crystallographic position with an acceptable value of RMSD and to validate the method for further evaluation of flavonoids. The docked conformation with the best energy was found with a RMSD value less than 1.0 amstrong, so the method was confirmed to be capable of found the correct conformation. Identical experiments were carried out with the rest of ligands in the training set (betamethasone and cortisol) and similar results were obtained, and therefore a binding mode for molecule in training set was identified.

Once the method was validated, we applied it to the compounds of the test set (Table 1). The results of these experiments were evaluated and were used to identify potential interactions with the GR. Mainly two kinds of interactions were found in the training and test sets: Hydrogen bonds and hydrophobic interactions. The first kind is due to the interactions that occur between the hydroxyl and ketone groups of the ligands and polar residues surrounding the cavity that binds the ligand. The second kind occurs when aromatic rings of the ligands interact with highly apolar residues around the cavity.

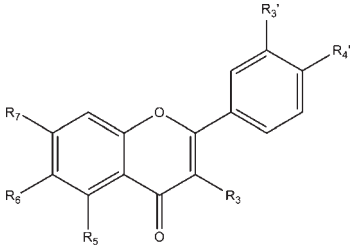
Analyzing the docked conformations, we identified three zones where hydrogen bonds can be found. The first one corresponds to the residues of Arg81 and Gln40 where ketone groups of the ligands tend to interact, the second one is placed near residues Gln111 and Thr205 and bind with hydroxyacetyl chains. In the last one, Leu33 and Asn34 interact with hydroxyl group in the C ring of training set molecules (Figure 1 and 2). Hydrophobic interactions in the pocket are due to Met30, Phe31, Leu33, Val41, Trp70, Met71, Met74, Met115, Tyr210, Leu219 and Ile 22 that surround the ligand and form the cavity in which this binds. For the test set, the distance and nature of the interactions are summarized in the Table 2. Apart from the residues identified in the training set, new binding modes were found that implies new hydrogen bonds with Cys202, Leu198 and Met30 backbones.

3.2. Molecular dynamics

MD trajectories were inspected to check the stability of complexes, using de RMSD values of C α atoms compared to the initial conformation. After 60 ps of the production run, the complexes were found stable in all cases, with values of RMSD ranging from $1.29\text{\AA} \pm 0.21$ to $1.58\text{\AA} \pm 0.22$ for the whole simulation. Despite of this short time needed to stabilize complexes, first 100 ps of the MD run were discarded as equilibration time in order to achieve even higher levels of confidence in the position of the ligands and the aminoacids of the binding pocket.

Hydrogen bonding during MD simulation between ligand and the surrounding environment were analyzed with g_hbond (GROMACS Hydrogen bond analysis tool) to check the stability in time of the docking results. In addition, energy values of complexes and free ligand forms were extracted and considered for LIE analysis.

Table 1. **Flavonoids included in the test set**

								
No	Compound	R3	R5	R6	R7	R3'	R4'	EC150*
1	Flavone	H	H	H	H	H	H	26.1
2	5-hydroxyflavone	H	OH	H	H	H	H	6.0
3	5-methoxyflavone	H	OCH3	H	H	H	H	5.5
4	6-hydroxyflavone	H	H	OH	H	H	H	7.1
5	6-methylflavone	H	H	CH3	H	H	H	3.6
6	6-methoxyflavone	H	H	OCH3	H	H	H	0.7
7	6-Chloroflavone	H	H	Cl	H	H	H	12.6
8	7-Hydroxyflavone	H	H	H	OH	H	H	3.1
9	7-methoxyflavone	H	H	H	OCH3	H	H	21.9
10	3-hydroxy-6-methoxyflavone	OH	H	OCH3	H	H	H	10.3
11	5,7 dihydroxyflavone	H	OH	H	OH	H	H	1.5
12	5,6,7 trihydroxyflavone	H	OH	OH	OH	H	H	18.9
13	4',5,7 trihydroxyflavone	H	OH	H	OH	H	OH	5.2
14	5,7 dihydroxy-4'-methoxyflavone	H	OH	H	OH	H	OCH3	2.1
15	3',4',5,7-tetrahydroxyflavone	H	OH	H	OH	OH	OH	18.0

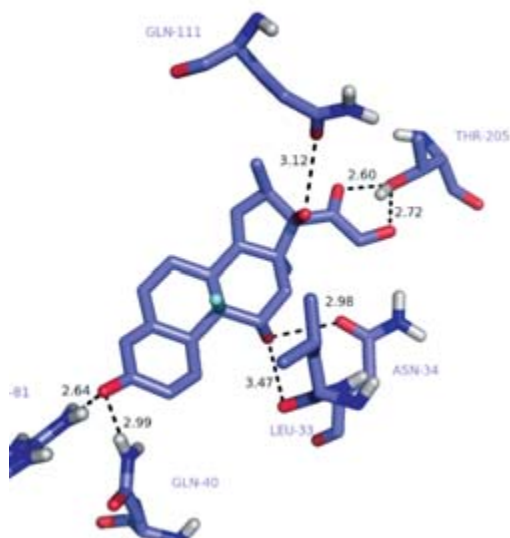


Figure 1. Dexamethasone-GR complex. Binding mode of dexamethasone is shown with hydrogen bonds.

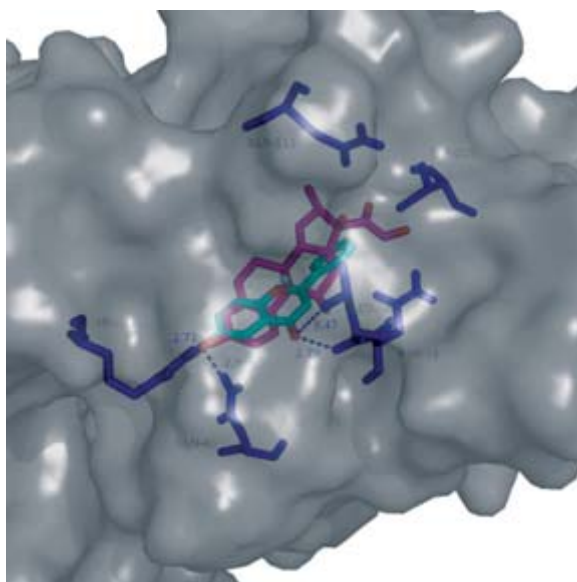


Figure 2. 6-methoxyflavone and dexamethasone. Flavonoid, in blue, superimposed on dexamethasone, in pink.

Table 2. **GR-flavonoids interactions.**

Compound	LEU33	ASN34	GLN40	ARG81	GLN111	THR205	Others
1	—	—	—	—	—	2.2	—
2	—	2.8	—	—	—	1.9	2.7-3
3	—	2.9-3.5	—	—	—	3.0	3.3
4	—	—	3.2	3.0	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—
6	2.8	—	3.0	2.7	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—
8	—	2.9-3.0	—	—	—	—	2.8-2.6-3.3
9	—	—	—	—	—	2.7	—
10	—	—	—	—	—	3.0	—
11	—	—	—	—	—	2.9	3.0-2.7
12	—	—	—	—	3.1	2.5	2.9-3.1
13	—	2.4-2.9	3.2	3.0	—	—	3.1-2.8
14	—	2.7	3.0	3.2	—	3.0	2,7-3.1-3.1
15	2.9	2.7	3.0	3.2	—	3.0	3.1-3.1-2.7
Dexamethasone	3.5	3.0	3.0	2.6	3.1	2.6-2.7	—
Betamethasone	3.3	3.0	2.9	2.7	3.3	2.9-3.0	—
Cortisol	3.0	3.0	3.1	2.8	3.1	2.6-3.1	—

Distances are shown in amstrong. Other summarizes Cys202, Leu198 and Met30 interactions.

Prior to extract energies from flavonoids complexes, we constructed a training set as described before. The values of the calculated and experimental energies are shown in Table 3, and the results for the best regression test can be seen in Figure 3. Best correlation was found for the pair values $\alpha = 0.42$ and $\beta = 0.5$. The value of α for van der Waals contribution is in good agreement with the fact that hydrophobic interactions in the case of GR are of great importance and the value of β is the same in the original method proposed for Aqvist *et al.* (6). However, according to Aqvist *et al.* (12) hydroxyl (OH) groups may affect β , decreasing its value the greater their number, hence a correction for the number of hydroxyl groups in molecules of the test set should be done, as in test set all the

ligand have 3 OH groups. To correct the underestimation of the electrostatic contribution in the molecule with less than 2 OH groups, $\beta = 0.52$ was chosen and to correct the overestimation of the same contribution in the case of more than 4 OH, $\beta = 0.48$ was selected.

After best coefficients were chosen, we used them to calculate the binding energy of the test set, checking obtained values with experimental values of activity in an *in vitro* gene assay (4) expressed as EC150 or the concentration of substance to produce 150% stimulation of luciferase (GR induced expression) activity.

Table 3. Training set energy values.

Compound	Log Kd	ΔG_{exp} (KJ/mol)	ΔG_{calc} (KJ/mol)
Dexamethasone	8.47 ^a	-48.3	-48.38
Betamethasone	8.45 ^a	-48.75	-47.56
Cortisol	8.15 ^b	-46.5	-48.96

(a) Values from EMEA (14). (b) Values from Eliard *et al.* (15).

As can be seen in Table 4, higher electrostatic contributions are found when more than 2 OH groups are present in the molecule. Indeed, this effect is due to an overestimation of the force field of the electrostatic interactions because the polarization effects are not

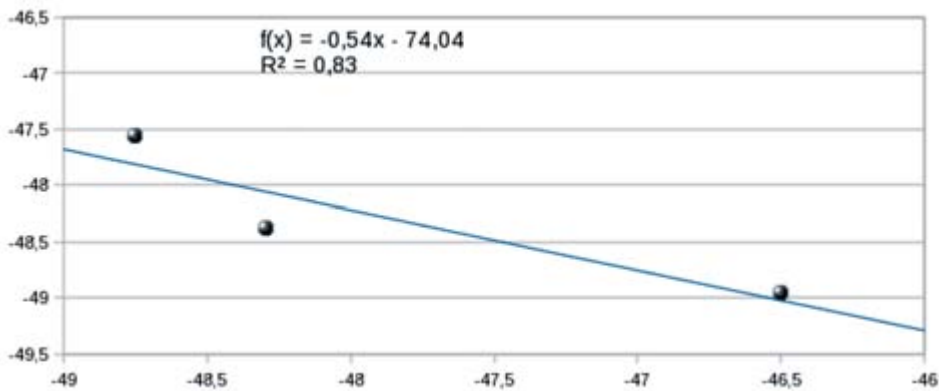


Figure 3. Training set regression test of calculated and experimental binding energies.

properly described, so lower values of b should be required in some cases.

Table 4. Test set energies and LIE parameters.

Compound	Free E _{vdw} (KJ/mol)	Free E _{eq} (KJ/mol)	A	B	OH Groups	ΔG_{calc} (kcal/mol)
1	12.727	78.981	0.42	0.52	0	-10.73
2	12.817	79.792	0.42	0.52	1	-11.21
3	12.830	79.787	0.42	0.52	0	-11.21
4	13.328	82.810	0.42	0.52	1	-11.64
5	13.147	81.671	0.42	0.52	0	-11.48
6	13.586	84.418	0.42	0.52	0	-11.87
7	13.327	82.770	0.42	0.52	0	-11.24
8	12.874	79.895	0.42	0.52	1	-11.23
9	12.710	78.919	0.42	0.52	0	-10.72
10	13.599	84.461	0.42	0.52	1	-11.47
11	12.846	79.876	0.42	0.50	2	-11.41
12	13.299	82.791	0.42	0.50	3	-10.84
13	13.762	85.701	0.42	0.50	3	-11.63
14	13.683	85.101	0.42	0.50	2	-11.55
15	13.686	85.188	0.42	0.48	4	-10.75
Dexamethasone	13.805	85.706	0.42	0.50	3	-11.57
Betamethasone	13.578	84.266	0.42	0.50	3	-11.38
Cortisol	13.874	86.480	0.42	0.50	3	-11.71

Figure 4 shows the regression test performed between the values of calculated energy of binding and the experimental values of EC₁₅₀. The squared correlation coefficient was found significant ($R^2 = 0.74$ and $p = 0.000$), hence a good correlation between calculated energy values and the agonist effect of the compounds can be expected.

However, although an acceptable value of correlation was found, in line with similar recent studies (16), some authors found slight

precision enhancements taking all possible orientations of ligands in the binding pocket into account (17), at the cost of reducing the time of the molecular dynamic simulations and obtaining less confidence in the stability of complexes. Thus, in this work, we chose improved security in the stability of complexes to an increase of conformations to be considered while maintaining computational costs affordable.

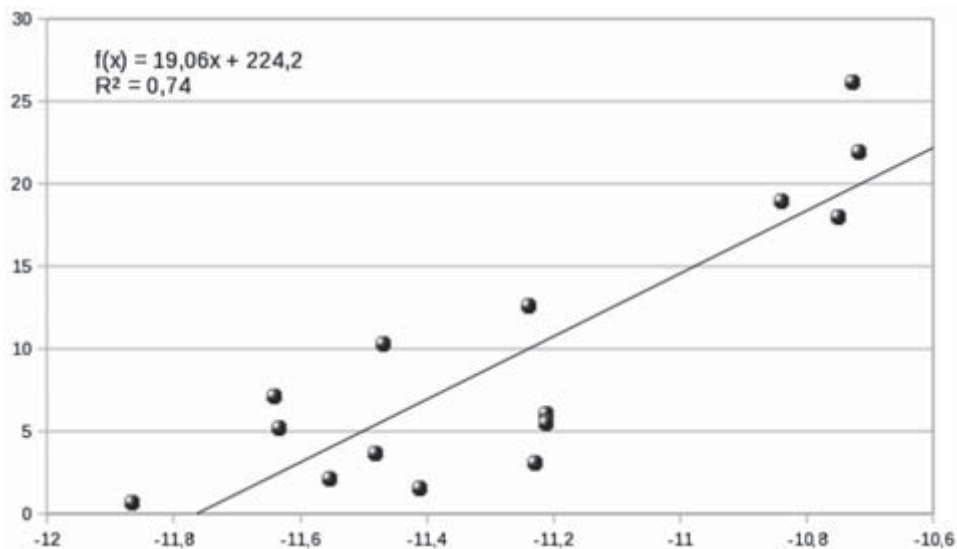


Figure 4. Correlation between calculated binding energy and EC150 for the test set.

3.3. Binding modes and molecular structure considerations

Evaluated flavonoids have a high shape similarity with natural agonist of GR. Indeed, in almost all cases a good overlap between cortisol and the test set molecules can be observed. In order to extract the most relevant structural features of the ligands, the presence of hydrogen bonds, the shape and the calculated binding energy were considered as the principal components when reviewing its capacity as agonists.

Analyzing the test set, two key factors can be identified: number and disposition of OH groups. Figure 5 shows the dependence between the number of OH groups and the energy of binding. In

fact, between 2 and 3 hydroxyl groups the best average energy of binding can be found, due to a better disposition for hydrogen bonding interactions with cavity residues.

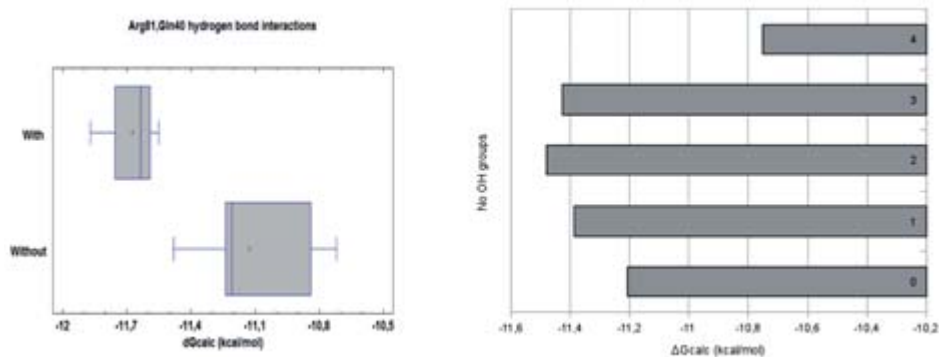


Figure 5. Statistical analysis of Arg81 interaction and energy dependency of number of OH groups.

Regarding the spatial arrangement of the groups, the analysis of the values in Table 2 clearly shows a trend towards better energy when introducing interactions that mimic those produced by the ligands in the training set, especially with the residues Arg81 and Gln40 and with Thr205. A statistical analysis of the two samples (with and without interaction at Arg81-Gln40) was carried out to identify the relevance of the interaction (t-value). The difference in average energy values was found within a significance of 95% ($p = 0.0049$). The rest of interactions were not found relevant to achieve lower energies of binding.

4. CONCLUSIONS

Here, we developed a computational model to describe the interactions of flavonoids with glucocorticoid receptor in high detail, allowing the design of new anti-inflammatory agents based on the hydroxyflavone skeleton. Hydrogen bonding was found to be the most important type of interaction, in special with residues Arg81 and Gln40 (with statistical significance) and Thr205.

In addition a new method is presented to predict the relative potency of flavonoids as glucocorticoids receptor agonists, with a good correlation with *in vitro* experimental values ($R^2 = 0.74$ and $p = 0.000$), and with the advantage of the LIE method, that allows to include the effects of solvent.

5. ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Cristóbal Rueda who made helpful suggestions and supported this work.

6. REFERENCES

1. Rekka, E. A. & Kourounakis, P. N. (eds.) (2008) *Chemistry and molecular aspects of drug design and action*. CRC Press: Boca Raton, FL 33487-2742.
2. Jang, D. S.; Cuendet, M.; Hawthorne, M. E.; Kardono, L. B.; Kawanishi, K.; Fong, H. H.; Mehta, R. G.; Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. (2002) Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*. 61(7): 867-72.
3. O'Leary, K. A.; de Pascual-Tereasa, S.; Needs, P. W.; Bao, Y. P.; O'Brien, N. M. & Williamson, G. (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* 551(1-2): 245-54.
4. Nishizaki, Y.; Ishimoto, Y.; Hotta, Y.; Hosoda, A.; Yoshikawa, H.; Akamatsu, M. & Tamura, H. (2009) Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(16): 4706-10.
5. Talhouk, R. S.; Karam, C.; Fostok, S.; El-Jouni, W. & Barbour, E. K. (2007) Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J. Med. Food*. 10(1): 1-10.
6. Aqvist, J.; Medina, C. & Samuelsson, J. E. (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* 7(3): 385-91.
7. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*
8. Schuttelkopf, A. W. & van Aalten, D. M. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60(Pt 8): 1355-63.
9. Bussi, G.; Donadio, D. & Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126: 014101.
10. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 18(2): 1463-1472.

11. Essman, U.; Perela, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H. & Pedersen, L. G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*. 103(19): 8577-8593.
12. Åqvist, J. & Hansson, T. (1996) On the Validity of Electrostatic Linear Response in Polar Solvents. *J. Phys. Chem.* 100(22): 9512-9521.
13. GNU/PSPP. 2007, Free Software Fundation. p. PSPP is a program for statistical analysis of sampled data.
14. C.f.v.m., *Betamethasone - Summary report*. 1999.
15. Eliard, P. H. & Rousseau, G. G. (1984) Thermodynamics of steroid binding to the human glucocorticoid receptor. *Biochem. J.* 218(2): 395-404.
16. Alam, M. A. & Naik, P. K. (2009) Applying linear interaction energy method for binding affinity calculations of podophyllotoxin analogues with tubulin using continuum solvent model and prediction of cytotoxic activity. *J. Mol. Graph Model.* 27(8): 930-43.
17. van Lipzig, M. M.; ter Laak, A. M.; Jongejan, A.; Vermeulen, N. P.; Wamelink, M., Geerke, D. & Meerman, J. H. (2004) Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. *J. Med. Chem.* 47(4): 1018-30.

*** Información de contacto:**

Álvaro Cortés Cabrera.

Unidad de Bioinformática.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.

C/ Nicolás Cabrera, 1. Campus de Cantoblanco.

28049 Madrid.

Teléf.: +34 91 373 55 28.

E-mail: acortes@cbm.uam.es

SESIONES CIENTÍFICAS

25 de marzo

Conferencia de la Doctora Consuelo de la Torre Quintana, Académica Correspondiente de la RANF, titulada: «La primera farmacología de minerales en español».

8 de abril

Conferencia del Excmo. Señor Don César Nombela Cano, Académico de Número de la RANF: «Antimicrobianos y pared celular: exploración racional de nuevas dianas farmacológicas de antifúngicos».

15 de abril

Mesa Redonda en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, sobre: «Actualizaciones en la enfermedad de Alzheimer». Ponentes: Doctor Javier de Felipe, Laboratorio de Circuitos Corticales (CTB) e Instituto Cajal (CSIC): «Las espinas dendríticas y cognición: alteraciones de la enfermedad de Alzheimer»; Doctor Juan Álvarez, Director Médico del Laboratorio PFIZER España: «Investigación de nuevos medicamentos en la enfermedad de Alzheimer», y Doctor Rafael Blesa, Director del Servicio de Neurología del Hospital de la Santa Creu i San Pau de Barcelona: «Tópicos típicos y expectativas mundanas acerca de la investigación del diagnóstico precoz y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer».

* * *

Conferencia por el Doctor Herbert Zimmermann, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, titulada: «A functional role for extracellular nucleotides in neurogenesis».

22 de abril

Mesa Redonda sobre: «Síntesis de fármacos: ¿Es la biotecnología una alternativa real?» Coordinador y Presentador: Doctor José María Sánchez Montero, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutico en la Facultad de Farmacia de la UCM y Académico Correspondiente de la RANF. Ponentes: Doctor José Carlos Menéndez, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la UCM y Académico Correspondiente de la RANF, y Doctor Andrés Alcántara León, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la UCM.

29 de abril

Conferencia del Doctor Rafael Sentandreu, Académico Correspondiente de la RANF, titulada: «Morfogénesis: Organización y biosíntesis de la pared celular de *Candida albicans*».

6 de mayo

Conferencia de la Profesora Doctora María Vallet Regí, Catedrática del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica en la Facultad de Farmacia de la UCM, titulada: «Biocerámicas y fármacos: una buena simbiosis».

13 de mayo

Conferencia del Ilmo. Señor Don Antonio Rodríguez Artalejo, Académico Correspondiente de la RANF, titulada: «Caracterización funcional del receptor nicotínico alfa9alfa10 de la médula adrenal: plasticidad inducida por estrés».

Nuestra Académica correspondiente, Doctora Consuelo de la Torre Quintana, fue entrevistada por el Instituto Gemológico español, con motivo de una conferencia que impartió en dicho Centro en enero de 2010 sobre «El Lapidario de Alfonso X el Sabio».

* * *

El 7 de abril falleció en Madrid nuestra Académica correspondiente, la Doctora Margarita Lorenzo Balado, Catedrática de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. La Doctora Lorenzo era una gran investigadora, especializada en procesos metabólicos.

* * *

El pasado día 7 de abril, dentro de las Sesiones Científicas conjuntas que organizan la Real Academia Nacional de Farmacia, el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y el Instituto Tomás Pascual para la nutrición y la salud, tuvo lugar una Jornada sobre «Inflamación y patogenidad. La respuesta inflamatoria en patologías cardiovasculares y en el envejecimiento», con la participación del Doctor Lisardo Boscá Gomar, Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Centro Mixto CSIC, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, quien pronunció una charla titulada: «La inflamación como causa de patogenidad en enfermedades cardiovasculares». A lo largo de su intervención se abordó la patología inflamatoria como causa de un 70-80% de enfermedades, entre las que destacan Alzheimer, anafilaxias, aterosclerosis, enfermedad de Crohn, daño isquémico/perfusión. También se puso de manifiesto la importancia de células como monocitos, macrófagos y neutrófilos, y de factores de transcripción como PPAR y LXR en los procesos inflamatorios. En la segunda intervención: «Efectos beneficiosos de la alimentación con complementos de soja sobre genes de longevidad», a cargo del Doctor José Viña Ribes, Catedrático de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, Facultad de Medicina y Odontología de Valencia.

Se habló de que la longevidad está asociada a los antioxidantes, a la hormona del crecimiento, a genes como P53, a una restricción calórica, al factor GRF1, etc. Actualmente su labor está centrada en encontrar genes asociados a longevidad e investigar cómo activarlos. Se sabe que los estrógenos y los componentes de la soja son capaces de activar estos genes. El empleo de estrógenos en mujeres menopáusicas puede ser perjudicial y por eso se utilizan isoflavonas de soja. En este sentido, se pronunció a favor de alimentos suplementados con soja frente al uso de genisteína como fármaco. Nos advirtió que se deben consumir estos alimentos en pequeñas cantidades y varias veces al día. La soja, como terapia hormonal sustitutiva, se debe emplear inmediatamente después de la menopausia. La soja, además de reducir la osteoporosis, protege contra la toxicidad del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer y se está estudiando un posible efecto preventivo frente a la diabetes tipo 2.

* * *

El Profesor Doctor Antonio Doadrio Villarejo, Académico Secretario de nuestra Corporación, ha sido investido Caballero de la Real Orden del Monasterio de Yuste, en una sesión solemne de la Orden celebrada en la Catedral-Mezquita de Córdoba y oficiada por el Vicario General. Esta Real Asociación tiene sus orígenes cuatro años después de la muerte del Emperador Carlos V (1558) y fue refundada en 1957, siendo su misión la guarda y custodia del Monasterio de Yuste y la transmisión del espíritu europeísta del emperador Carlos V.

* * *

El pasado 22 de marzo, en Sesión Ordinaria del Pleno de la Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia, fue nombrado Académico Correspondiente electo nuestro compañero José de Vicente González, Académico Correspondiente de nuestra Corporación.

* * *

El Doctor Eduardo L. Mariño, Catedrático de Farmacia Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y Acadé-

mico Correspondiente de nuestra Corporación ha tomado posesión como Académico en la Academia Iberoamericana de Farmacia el pasado día 12 de abril en Sevilla. El título de su discurso de ingreso fue: «De la Farmacia Galénica a la Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica con el horizonte de “Medication Therapy Management”».

* * *

El pasado 23 de abril nuestra Académica de Número, la Doctora María Cascales Angosto, ha recibido el título de «Hija Predilecta de Cartagena», en un acto celebrado en la Casa Consistorial donde, rodeada de numerosos familiares y amigos, se lo entregó la alcaldesa Pilar Barreiro. Policías de gala y maceros custodiaban la entrada al Ayuntamiento. Primogénita de doce hermanos, María Cascales nació en Cartagena en agosto de 1934. Su padre era ingeniero naval de la sociedad de construcciones navales y su madre procedía de una familia muy conocida. A pesar de haber desarrollado la mayor parte de su actividad científica en Madrid, como investigadora del CSIC, siempre ha llevado muy dentro su Cartagena natal. A ella regresa asiduamente para ver a familiares y amigos, y en ella disfruta «del mar y de los amaneceres y atardeceres que extasían el alma y calman el espíritu», subrayó la científica en su discurso. El de hijo predilecto es el mayor título que el Ayuntamiento da a personas nacidas en Cartagena que han destacado por su labor más allá del municipio.

* * *

El pasado día 26 de abril se celebró, en sesión pública extraordinaria en el Salón de Actos de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, el ingreso como Académico Correspondiente del Excmo. Doctor Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, con la lectura del discurso: «Análisis y control de medicamentos: su trascendencia en el ciclo de vida de un medicamento». Presentó al nuevo académico la Ilre. Doctora M.^a Asunción Alsina Esteller.

* * *

El pasado día 28 de abril se celebraron en la RANF unas jornadas sobre Nutrigenómica y Metabólica Nutricional, organizadas por

el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, la Real Academia Nacional de Farmacia y el Instituto Tomás Pascual Sanz para la Nutrición y la Salud, con la participación del Doctor J. Alfredo Martínez Hernández, Catedrático de Nutrición de la Universidad de Navarra, quien se refirió a los aspectos más interesantes de la Nutrición personalizada y Nutrigenómica, tema de gran actualidad en este campo. También se contó con la participación de la Doctora Isabel Bondía Pons, colaboradora investigadora de la Universidad de Navarra, quien expuso los últimos avances en metabolómica nutricional. El acto contó con gran asistencia de público.

* * *

El pasado jueves 29 de abril fue presentado el libro «Recomendaciones en nutrición y hábitos de vida saludable desde la Oficina de Farmacia», en la Real Academia Nacional de Farmacia, con la presencia de María Teresa Miras, Presidenta de la Real Academia de Farmacia; Alberto García Romero, Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, y Ricardo Fluxá, Presidente del Instituto Tomás Pascual. El libro responde a la necesidad de dar respuestas a muchos ciudadanos preocupados por mejorar su salud y la de su entorno y proviene de unas jornadas sobre nutrición celebradas en la Real Academia Nacional de Farmacia. Las jornadas, celebradas con gran éxito, demostraron el creciente interés de nuestros profesionales y la gran oportunidad que se les brinda de una formación continuada y exigente que redunda en beneficio de todos. El libro contiene 16 capítulos, donde 22 especialistas en los diversos aspectos de la nutrición dan una visión actualizada en sus áreas de competencia. La primera parte está dedicada a las alergias e intolerancias alimentarias, problemas con cada vez mayor incidencia por la inclusión de componentes novedosos en la alimentación. Continúa con la importancia de los productos lácteos y el calcio en el control de la obesidad. Prosigue con los consejos y el seguimiento nutricional desde la oficina de farmacia. Finalmente recoge una serie de recomendaciones de hábitos de vida saludable.

* * *

El Defensor del Pueblo, Enrique Múgica, impartió el 5 de mayo una conferencia en la Real Academia Nacional de Farmacia, dentro

de los actos que ha organizado el Centro Farmacéutico Nacional, para conmemorar el centenario de su creación. Enrique Múgica estuvo acompañado en el acto por el presidente de Centro Farmacéutico Nacional, Rafael Conde y la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, María Teresa Miras.

* * *

El pasado día 6 de mayo fue inaugurado oficialmente el canal privado de televisión de la RANF con la Conferencia de la Profesora Doctora María Vallet Regí, Catedrática del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica en la Facultad de Farmacia de la UCM, titulada: «Biocerámicas y fármacos: una buena simbiosis». Este nuevo portal constituye una apuesta importante de esta institución por las nuevas tecnologías, así como una poderosa herramienta de difusión de la ciencia.

* * *

Nos comunican el fallecimiento, ocurrido el pasado día 23 de febrero de 2010, del Profesor Emérito Wolfgang A. Ritschel en Cincinnati a los setenta y siete años de edad después de una larga enfermedad. El Profesor Ritschel era Académico Correspondiente extranjero de nuestra Corporación y miembro del Comité Científico Internacional de la Academia.

* * *

El pasado 13 de mayo se celebró una Junta General Extraordinaria para la elección de Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, resultando elegido el Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez Fernández (Medalla n.º 45). En la sesión científica celebrada esa misma tarde, la Excma. Señora Presidenta de la RANF, Doña María Teresa Miras, elogió y agradeció públicamente la labor desempeñada por la vicepresidenta saliente, la Excma. Señora Doña Ana María Pascual Leone.

