

Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto

María del Carmen Avendaño López

Académica de Número de la RANF.
Recibido el 2 de diciembre de 2010.
e-mail: avendano@farm.ucm.es

RESUMEN

Se revisa la importancia de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos y se analizan las ventajas e inconvenientes de su utilización como compuestos modelo. Se discute la idoneidad de esta metodología para encontrar fármacos de acción específica, el impacto que puede originar en los ecosistemas, y los intentos para generar compuestos bioactivos por tratamiento de extractos naturales inactivos. Se hace una especial mención a los productos naturales de origen marino, se comentan algunos procesos semisintéticos y se describen ejemplos de los nuevos abordajes que permite la ingeniería genética para optimizar su producción o lograr la biosíntesis combinatoria.

Palabras clave: Productos naturales; descubrimiento de fármacos; productos de origen marino; ingeniería genética.

ABSTRACT

Natural Products as Sources of New Drugs. A general overview

The significance of natural products in drug discovery, as well as their advantages and drawbacks as model compounds, are examined. The suitability of this methodology to find drugs with specific activity, its possible impact in the ecosystems, and attempts to generate bioactive compounds through chemically engineered inactive extracts are analyzed. Special mention is given to marine natural products, semisynthetic methodologies, and description of new approaches to optimize the production of natural products or to generate structural diversity through engineering biosynthetic pathways.

Key words: Natural products; drug discovery; marine natural products; genetic engineering.

1. ¿QUÉ SIGNIFICAN LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS?

La naturaleza, y sobre todo las plantas, han contribuido enormemente desde la antigüedad a la medicina. En Mesopotamia se utilizaban alrededor del año 2600 antes de Cristo unas 1000 sustancias derivadas de plantas, y en el papiro de Ebers, escrito en el año 1500 antes de Cristo, se mencionan alrededor de 700. Datos semejantes podemos encontrar en China e India. Los griegos y los romanos racionalizaron el uso de estas drogas, destacando entre ellos Dioscórides y Galeno. Estos conocimientos se preservaron por los árabes en los siglos V-XII y, posteriormente han continuado jugando un importante papel en la salud humana (1), sobre todo en el tratamiento del cáncer (2).

Los productos naturales son metabolitos secundarios de plantas, hongos, y organismos marinos cuya función no se conoce con exactitud, aunque se cree que muchos se originaron en estos seres para defenderse de diversos agentes externos (3). Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales poseen actividades biológicas muy altas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos (4). De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte del arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales en algunos casos para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica (5). De los 1010 nuevos fármacos aprobados por la FDA desde enero de 1981 hasta junio de 2006, 43 eran productos naturales inalterados y 232 (un 23%) eran derivados de productos naturales encuadrados en la denominada segunda generación (6). Dentro de éstos encontramos al docetaxel (Taxotere®), un análogo de paclitaxel (Taxol®) más potente y más soluble, y a los antibióticos claritromicina (Biaxin®) y azitromicina (Zitromax®), ambos derivados de eritromicina (Figura 1). Los taxanos actúan estabilizando los microtúbulos y, junto con los inhibidores de la polimerización de tubulina (7), se emplean muy frecuentemente en la quimioterapia del cáncer (8).

A pesar de estos éxitos, con la llegada de la robótica, la bioinformática, la biotecnología, el modelado molecular (o química *in silico*), el cribado de alto rendimiento (HTS), y los métodos de síntesis combinatoria (9), empezó a decaer en la década de los 90 la utilización de los productos naturales para descubrir y desarrollar nuevos fármacos. En especial, los métodos combinatorios se consideraron una panacea, ya que permiten la obtención rápida de una gran cantidad de compuestos entre los que pueden encontrarse “cabezas de serie” (*lead compounds*). Sin embargo, hoy día muchos investigadores se preguntan si ha llegado el momento de devolver a los productos naturales la posición preeminente de que gozaron (10).

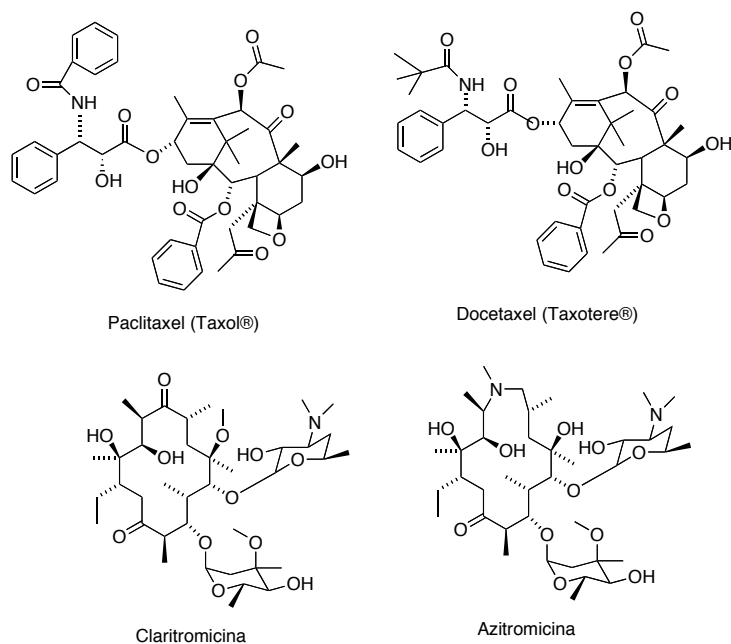


Figura 1.

2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE UTILIZAR LOS PRODUCTOS NATURALES COMO ESTRUCTURAS MODELO

El talón de Aquiles de esta aproximación en la búsqueda de fármacos ha sido siempre la baja disponibilidad de estos productos, debido a que se aíslan en cantidades muy pequeñas, y a su estructura generalmente compleja, que hace difícil el abordaje industrial de su síntesis total. Por ello, es frecuente que su síntesis y la de sus análogos requieran el desarrollo de métodos semisintéticos. Los antitumorales paclitaxel (Taxol®) y camptotecina, al igual que otros compuestos como la artemisinina, un antimalárico muy potente (Figura 2) (11), se aíslan de plantas que ya se utilizaban en la medicina tradicional (12) pero su conversión en fármacos tuvo muchas dificultades. En el caso de paclitaxel, no sólo fue necesario resolver muchos problemas químicos y farmacológicos, sino que fue muy importante el descubrimiento de un nuevo mecanismo de acción (13). En el caso de artemisinina fue necesario resolver su semisíntesis (ver la Figura 7) y desarrollar derivados con mayor vida media como β -artemeter. La combinación de estos últimos con otros antimaláricos tradicionales, como la mefloquina, a fin de evitar las resistencias del parásito asociadas a la mutación del gen que codifica la enzima denominada SERCA Pf6ATPasa, ha supuesto un notable avance en el tratamiento de la malaria (14).

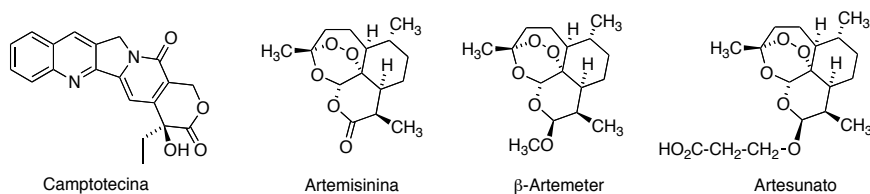


Figura 2.

La gran **ventaja** de los productos naturales es la **novedad de sus estructuras**, que difícilmente podrían haber sido el resultado de un razonamiento humano por muy creativo que fuese. Pensemos en el ya citado paclitaxel, en la ivermectina, una mezcla de macrólidos aislada de *Streptomyces avermitilis* que es uno de los antihelmínticos más eficaces que existen y genera ventas de alrededor de mil millones de dólares anuales, o en la ciclosporina o el tacrolimus (FK 506) (Figura 3), sustancias que también fueron aisladas de hongos y se emplean para evitar el rechazo de órganos transplantados porque suprimen la respuesta inmune (15).

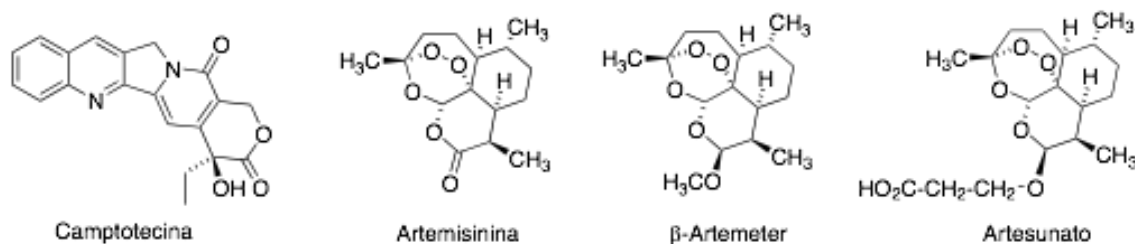


Figura 3.

3. ¿SON LOS PRODUCTOS NATURALES MODELOS ADECUADOS PARA LA BÚSQUEDA DE FÁRMACOS DE ACCIÓN ESPECÍFICA?

Partiendo del supuesto más que probable de que los productos naturales se biosintetizan para facilitar la interrupción del funcionamiento normal de diversas cascadas biológicas y, en consecuencia, producir la muerte de los organismos competidores, se discute si su relevancia en el arsenal terapéutico se debe a una aproximación tradicional al descubrimiento de fármacos o se corresponde con sus propiedades intrínsecas, ya que su propensión a interactuar con varias dianas biológicas puede no ser una ventaja a la hora de encontrar fármacos dirigidos a interactuar con proteínas expresadas por genes causantes de una enfermedad.

Las aproximaciones a una terapia personalizada requieren entender la relación entre los genes que expresan las proteínas reconocidas como dianas de los productos naturales y los asociados con las enfermedades humanas. Parece que las dianas relacionadas con las enfermedades no controlan procesos aislados ni demasiado esenciales, situándose a mitad del camino que existe entre las proteínas esenciales que controlan la encrucijada entre varias vías de señalización, y las que controlan el final de estas rutas. En este escenario, los productos naturales tenderían a interactuar con las proteínas esenciales en vez de con las más específicas, a las que suelen dirigirse los fármacos sintéticos. Este supuesto parece razonable teniendo en cuenta que los organismos biosintetizan estos productos como “armas químicas” y, por tanto, serán mejores cuanto mayor sea su poder destructivo (16).

Sin embargo, esta visión puede estar sesgada por el hecho de que sus defensores se encuadran en la corriente que propone la síntesis orientada a la diversidad (diversity-oriented synthesis, DOS), una metodología que trata de maximizar el número de estructuras producidas a través de un único esquema de síntesis a fin de disponer de un gran número de ellas en cantidades discretas. En cierto modo, sus objetivos se contraponen con los de la síntesis de productos

naturales, que se dirigen a la síntesis de una molécula específica (17).

No hay duda de que los productos naturales tienen una gran afinidad por la diana para la que están dirigidos, lo que se demuestra por la menor afinidad que muestran sus fragmentos obtenidos por síntesis química. Por otra parte, su biodisponibilidad suele ser aceptable aunque no sigan la regla de Lipinski o regla de los 5, que predice la baja absorción de los compuestos que para formar enlaces de hidrógeno poseen más de 5 grupos donadores de H y más de 10 (5x2) aceptores de H, de los que poseen un peso molecular mayor de 500 y aquéllos cuyo logaritmo del coeficiente de reparto es mayor que 5 (18).

Aunque sus estructuras suelen ser grandes y contener varios centros estereogénicos, poseen una flexibilidad que les permite adoptar diferentes conformaciones, de forma que su unión a las proteínas se produce con una pequeña pérdida de entropía. **El gran tamaño y la compleja estructura de los productos naturales facilitan que éstos puedan interactuar con procesos biológicos complejos como son las interacciones proteína-proteína**, un objetivo tradicionalmente difícil para una pequeña molécula obtenida por síntesis orgánica aunque provenga de metodologías combinatorias u orientadas a la diversidad.

Resulta relevante el hecho de que muchos productos naturales no han encontrado competidores entre las moléculas pequeñas procedentes de la síntesis orgánica. Por ejemplo la calcineurina, que es la diana de la mayoría de los fármacos inmunodepresores, es una fosfatasa que activa las células T del sistema inmune a través de la defosforilación del factor de transcripción NFATc (*Nuclear Factor of Activated T cell, cytoplasmic*). Esta hidrólisis permite la traslocación de este factor al núcleo donde promueve la expresión de IL-2 (*interleukin 2*), y ésta, la respuesta de las células T. El primer inhibidor de calcineurina fue la ciclosporina, un péptido cíclico aislado del hongo *Tolypocladium inflatum*. Desde que se aprobó en 1983, sólo se han aprobado como inhibidores de calcineurina tacrolimus (Figura 3), una macrolactona aislada de *Streptomyces tsukubaensis*, y pimecrolimus, otra macrolactona de semisíntesis obtenida por modificación de la ascomicina (Figura 4). Análogamente, entre los inhibidores de la cinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que actúan como reguladores de ARNs mensajeros específicos, encontramos otra macrolactona aislada de *Streptomyces hygroscopicus*, la rapamicina (sirolimus) y su análogo temsirolimus.

4. ESTRATEGIAS DIRIGIDAS A LA PRESERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD. USO DE LA TECNOLOGÍA PARA CULTIVAR PLANTAS MEDICINALES

Un importante problema en la utilización de productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos es el agotamiento de las plantas y organismos que los producen con la consiguiente pérdida de biodiversidad. Se cree que los productos naturales que quedan sin descubrir son innumerables y se teme que, dada la velocidad a la que están extinguiéndose muchas especies, puedan desaparecer ecosistemas completos antes de que los componentes químicos de las especies que los pueblan se hayan examinado químicamente.

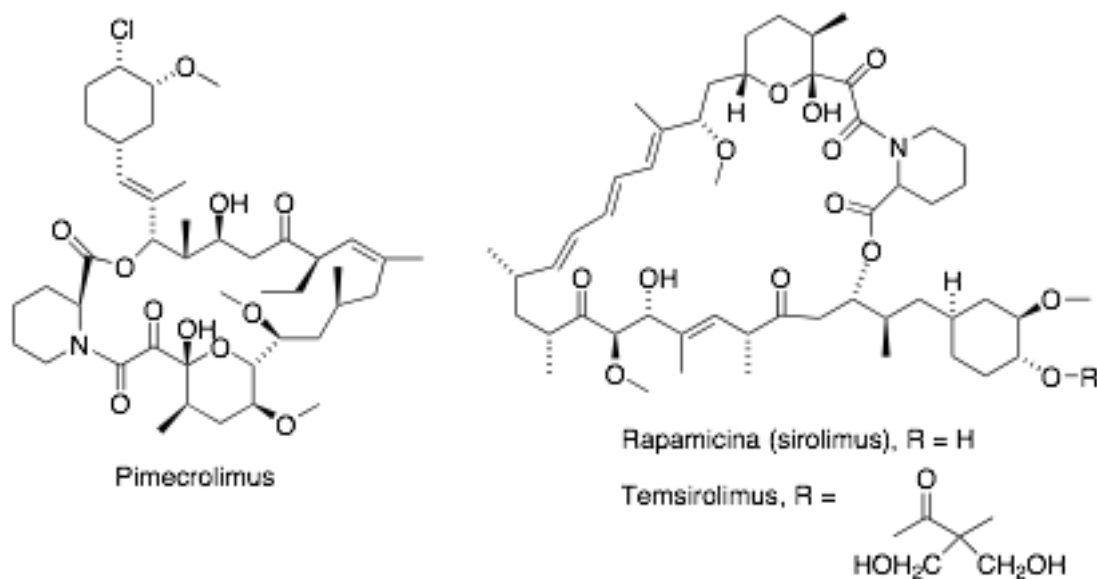


Figura 4.

Para promover la investigación de fármacos procedentes de la naturaleza y paliar el problema de la extinción de especies vegetales sobre todo en los países tropicales, se han organizado consorcios con empresas farmacéuticas que se comprometen a conservar la biodiversidad a cambio de compartir con la población de la zona los derechos de la posible explotación de los fármacos y otras sustancias químicas que pudieran descubrirse. En Costa Rica, por ejemplo, se creó en 1989 el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO) en consorcio con la firma farmacéutica Merck. Esta experiencia facilitó en 1993 la creación en EEUU de los “Grupos Internacionales para la Cooperación en Biodiversidad”, financiados por el *National Institute of Health*, la *National Science Foundation* y la *Agency for International Development*. En 1991 se inició la Red Latinoamericana para la Investigación de Compuestos Naturales Bioactivos (LANBIO), etc.

Actualmente, una vía muy interesante para que los productos naturales puedan recuperar su protagonismo es lograr que la naturaleza no sólo sea el lugar de su descubrimiento, sino también una fuente práctica y económica para su producción utilizando la biotecnología para cultivar plantas medicinales. El desarrollo comercial de los productos farmacéuticos derivados de plantas ha avanzado con la publicación de directrices para el cultivo de estas plantas modificadas genéticamente.

5. ESTRATEGIAS PARA GENERAR COMPUESTOS BIOACTIVOS POR DIVERSIFICACIÓN QUÍMICA DE MEZCLAS DE PRODUCTOS NATURALES INACTIVOS (EXTRACTOS NATURALES)

Los extractos naturales contienen en su mayoría bibliotecas de un gran número de compuestos que, aunque no se hayan caracterizado, poseen diferentes estructuras y grupos funcionales que pueden alterarse químicamente. Estas transformaciones pueden dar lugar a cambios en las propiedades biológicas de sus componentes. Si los grupos funcionales más comunes en la naturaleza se

transforman en grupos funcionales que raramente se encuentran en ella se podría disponer de estructuras novedosas y quizás activas. Por ejemplo, un grupo funcional muy común es el grupo carbonilo. Según el “Diccionario de Productos Naturales”, alrededor de un 80% de las 147.852 estructuras de su base de datos contiene al menos un grupo carbonilo. De ellas la mayor parte son ésteres, o cetonas, seguidas de los ácidos carboxílicos, las amidas y los aldehídos (19). Basándose en la reactividad química de estos grupos funcionales se han diversificado los componentes de extractos naturales por tratamiento de los mismos con hidrato de hidrazina a fin de convertirlos en hidrazonas o acilhidrazinas (20).

6. PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MARINO

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de productos naturales bioactivos de origen marino, fundamentalmente en el área del cáncer (21), pero también en otras. Algunas neurotoxinas pépticas de dinoflagelados y moluscos, que suelen ser venenos paralizantes, ya se han comercializado como veremos más adelante para el tratamiento del dolor. Los océanos abarcan el 70% de la extensión de nuestro planeta y su diversidad biológica constituye el 95% de toda la biosfera, calculándose que el número de formas de vida microscópicas que pueden existir en los medios marinos es del orden de 3×10^{28} . Además, según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI), el porcentaje de extractos activos de origen marino es muy superior a los de origen terrestre debido a las condiciones extremas en las que viven muchos de ellos. Esta gran riqueza se enfrenta todavía al problema de cómo cultivar estas formas de vida en un laboratorio.

Tras muchos años de investigación académica y la implicación esporádica de las grandes compañías farmacéuticas, este área ha renacido extraordinariamente en los últimos años debido a la aprobación por parte de las agencias FDA y EMEA de un buen número de fármacos (22), como el analgésico no opioide ziconotida (Prialt®) y el antitumoral trabectedina (ET-743, Yondelis®).

La ziconotida (Figura 5) es un péptido de 25 aminoácidos derivado sintético de la conotoxina-] M-VII-A, aislada de un veneno del caracol marino *Conus magus*. Este péptido actúa como un antagonista del calcio, y se usa en el dolor crónico administrándose en el fluido cerebroespinal usando una bomba de infusión por vía intratecal (23). A pesar de la gran desventaja que supone su vía de administración, este fármaco posee dos ventajas importantes: comparado con otros analgésicos su poder adictivo se considera bajo o nulo, y posee un potencial analgésico 1000 veces superior a la morfina.

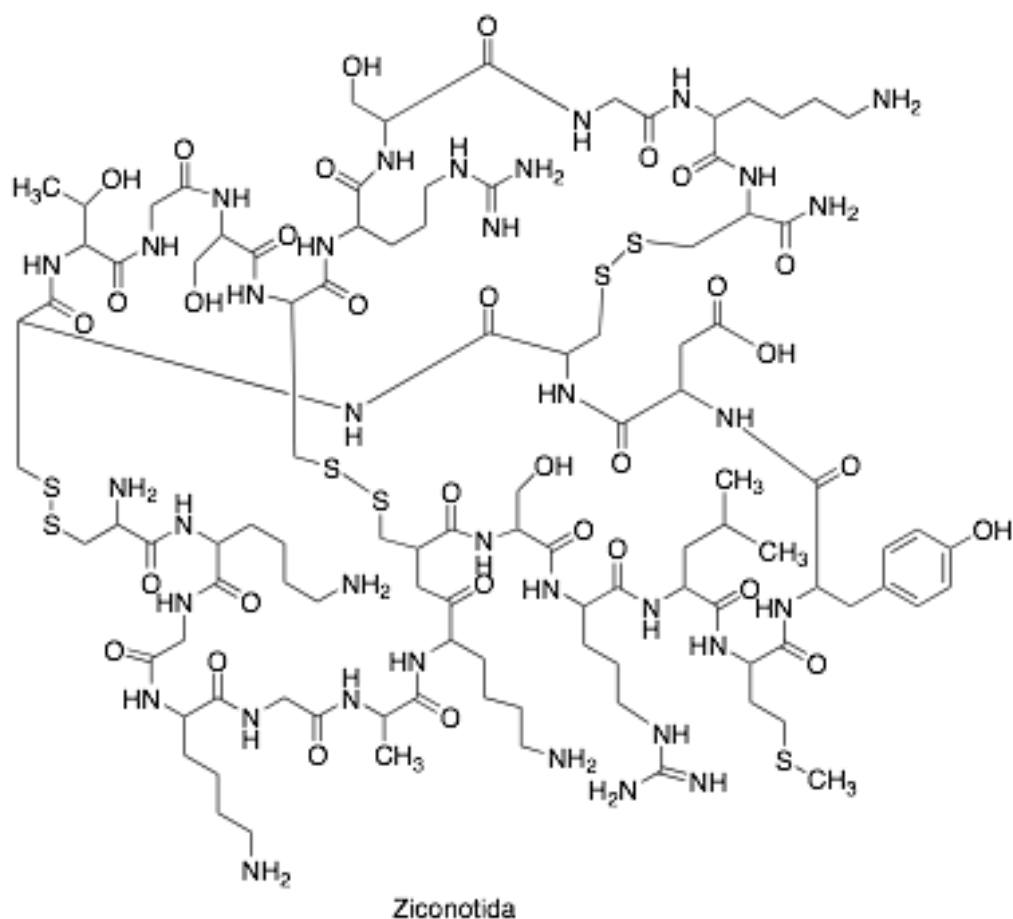


Figura 5.

La trabectedina, un alcaloide tetrahidroisoquinolínico aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata* y desarrollado por Pharmamar, ha sido el primer antitumoral de origen marino aprobado para su uso clínico. Actualmente se produce industrialmente por semisíntesis partiendo del metabolito microbiano *safracina B*, producido por fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* A2-2 (Figura 6) (24).

Ésta y otras empresas tienen en distintas fases de desarrollo clínico distintos derivados procedentes de fuentes marinas (25), y un gran número de otros productos naturales son activos sobre dianas específicas (26).

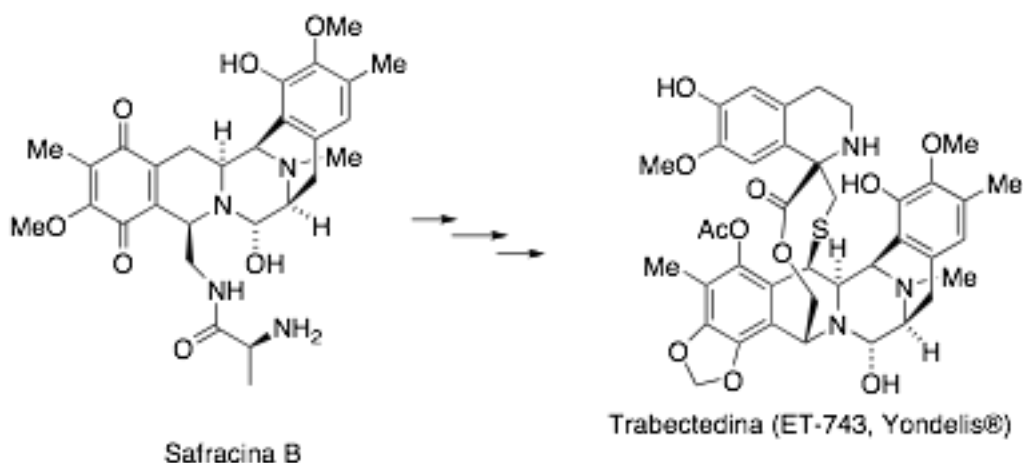


Figura 6.

7. LA TERCERA GENERACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

En esta generación pueden encuadrarse los productos que se originan por aplicación de la ingeniería genética en los organismos productores de un producto natural de interés. Los rápidos avances de la biología molecular, especialmente la secuenciación de genes, están invadiendo también la investigación de productos naturales.

La ingeniería biológica, es un interesante complemento de la síntesis orgánica, ya que puede desarrollar organismos productores alterados genéticamente, de forma que se obtenga un determinado producto natural o se generen colecciones de diversos análogos con mayor eficacia que si se emplea la síntesis orgánica. Dichos compuestos deben retener la alta actividad de los productos naturales, pero pueden tener mayor selectividad, menor toxicidad, mejor farmacocinética, encontrar nuevas aplicaciones, e incluso encontrar nuevos mecanismos de acción. Un ejemplo de la primera de estas aplicaciones se relaciona con la producción de artemisinina. Su semisíntesis, indicada en la Figura 7, se verá superada en un futuro si se consigue clonar los genes de la planta que intervienen en su biosíntesis e insertarlos en *E. coli*.

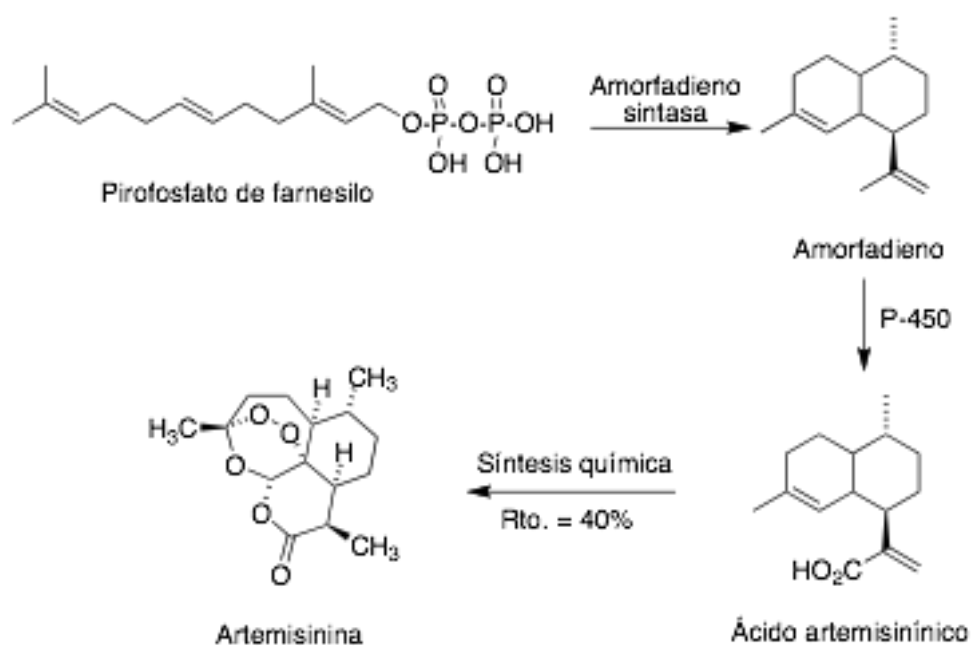


Figura 7.

La segunda de estas aplicaciones se denomina biosíntesis combinatoria y trata de hacer lo que la naturaleza no ha hecho todavía. El conocimiento molecular de los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, especialmente relacionados con péptidos (*non ribosomal peptide synthetases*, o NRPS) y macrólidos policétidos (*poliketide synthetases* o PKS), y la posibilidad de silenciarlos o combinar distintos módulos para alterar estructuras definidas, abre un campo extraordinario para la búsqueda de fármacos utilizando productos naturales como modelo.

Los antibióticos claritromicina y azitromicina así como los inhibidores de hidroximetil-coenzima A reductasa (HMG-CoA) simvastatina, provastatina y lovastatina (Figura 8) y el inmunosupresor sirolimus (Figura 4), son policétidos. Este grupo de productos naturales es especialmente fructífero, sólo las ventas de los 6 fármacos mencionados representan una enorme cantidad de dinero.

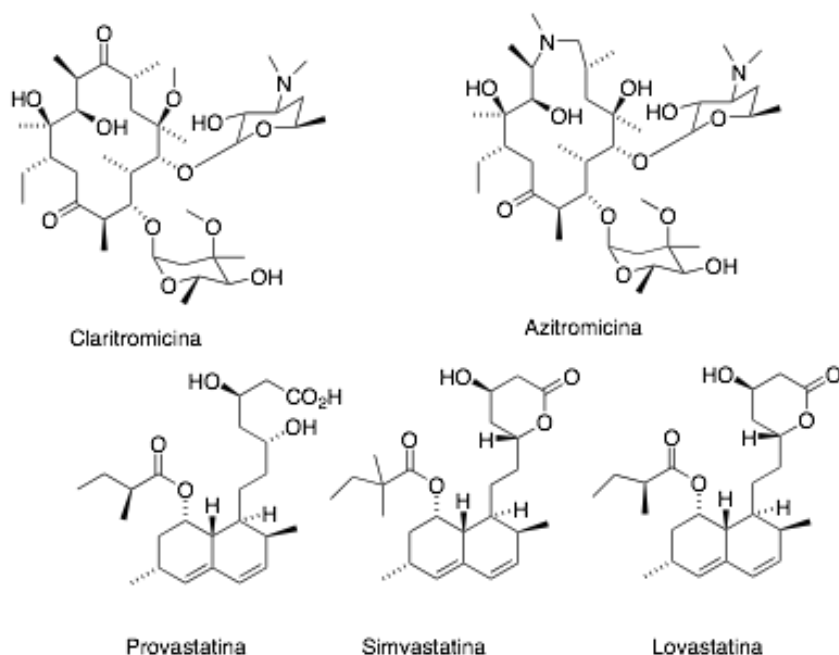


Figura 8

Aunque la estructura de los policétidos es muy diversa, todos comparten un mismo esquema de biosíntesis en el que las enzimas del grupo policétido-sintasa (PKS) catalizan la sucesiva condensación de diversos ácidos carboxílicos (CoAs) como unidades iniciales o extensoras a través de enlaces tioéster que incorporan unidades de 2 átomos de carbono a la cadena en crecimiento (Figura 9). Estos policétidos lineales se modifican posteriormente para dar los productos naturales finales. Sobre esta base, la bioingeniería puede introducir cambios en esta ruta incorporando como nutrientes diferentes unidades extensoras con estereoquímica o estados de oxidación diferentes antes de que se realice la modificación post-PKS.

Así, la empresa Biótica ha desarrollado un mutante de *Streptomyces hygroscopicus* que carece de un gen pre-PKS implicado en la biosíntesis de la unidad de partida en la ruta biosintética que conduce a rapamicina (sirolimus) y, adicionando al medio de cultivo distintos ácidos sintéticos, ha producido un gran número de análogos algunos de los cuales han mostrado mejores propiedades farmacocinéticas. También ha desarrollado un programa basado en la macbecina (ver Figura 10), un inhibidor de una chaperona denominada HSP90 (de la familia *heat-shock proteins*) que está implicada en el mantenimiento de varias proteínas sobreexpresadas o mutadas en varios tipos de cáncer, como el factor de transcripción p53, la cinasa HER2 y otras (27). En su biosíntesis, la subestructura de quinona se produce por hidroxilación post-PKS y posterior oxidación del fenol resultante. La empresa creó un mutante de la subespecie que fabrica la macbecina que carecía del gen post-PKS responsable de la oxidación del fenol a quinona. Alguna de las hidroquinonas así producidas fue mejor tolerada y mucho más potente que tanespimicina (17-AAG, 17-alilaminogeldanamicina).

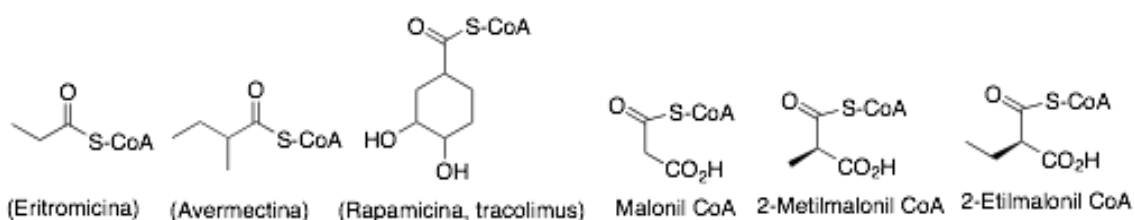


Figura 9.

En el año 2005 se creó en España la empresa *spin-off* de la Universidad de Oviedo EntreChem, que persigue entre otras cosas la optimización de productos naturales dirigidos al tratamiento del cáncer. Uno de los productos naturales que ha modificado es el policétido mitramicina (ácido aureólico o plicamicina, Figura 10), un inhibidor del factor de transcripción SP-1 que se enlaza directamente al ADN y promueve la expresión genética regulando la metilación de las histonas. Como todos los policétidos, la mitramicina se produce a través de la condensación sucesiva de unidades de CoAs y, posteriormente, tiene lugar la ciclación y la glicosilación. La bioingeniería combinatoria permitió la biosíntesis de diferentes productos de glicosilación análogos de mitramicina, algunos de los cuales mostraron mayor actividad y menor toxicidad. También aisló los genes responsables de la biosíntesis de los alcaloides indolocarbazólicos estaurosporina y rebecamicina), producidos por *Streptomyces staurosporeus* y *Saccharothrix aerocoligenes*, respectivamente. Ambos son inhibidores de varias cinasas y de topoisomerasas, y esta promiscuidad de acción así como su baja solubilidad en agua les hacen inadecuados para su utilización terapéutica. Por ingeniería genética la citada empresa creó, manipulando fundamentalmente la glicosilación, una biblioteca de compuestos con mucha mayor selectividad y especificidad frente a determinadas cinasas (28).

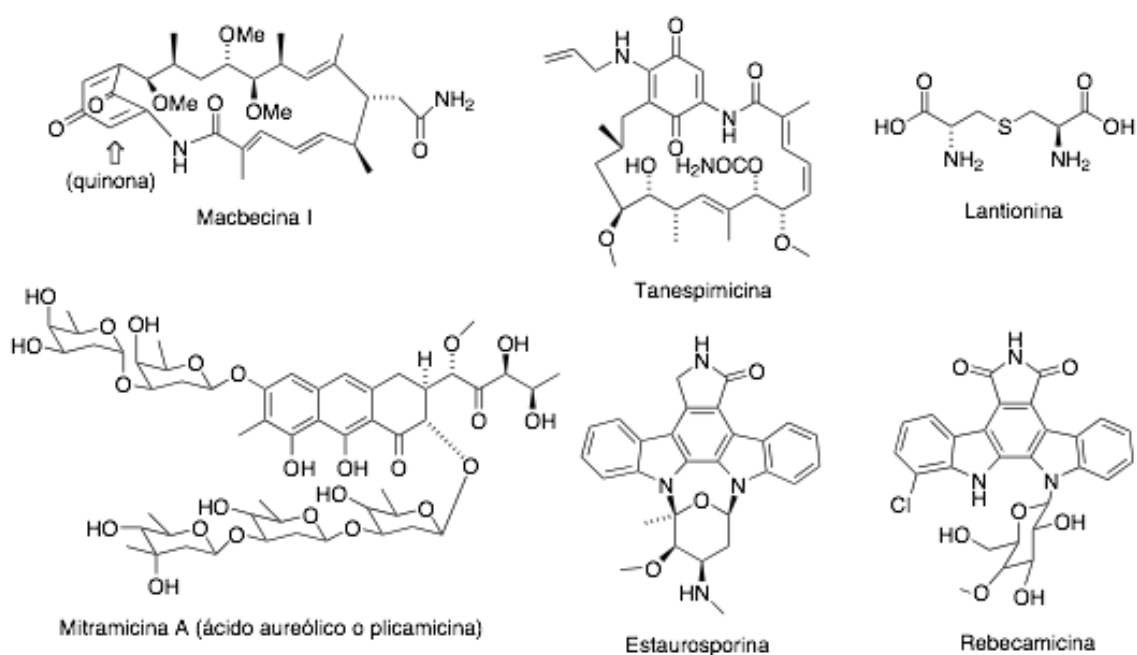


Figura 10.

La empresa inglesa Novacta está especializada en lantibióticos, péptidos

ribosómicos con actividad antiinfecciosa que contienen deshidroalanina, ácido 2-aminoisobutírico y aminoácidos con agrupamientos tioéter como lantionina (Figura 10) o metillantionina, Estos péptidos se producen por un gran número de bacterias Gram positivas de los géneros *Streptococcus* y *Streptomyces* para atacar a otras bacterias Gram positivas (29). Tras identificar cuáles son las regiones activas de su estructura para conservarlas y hacer análogos más útiles que los péptidos naturales, la bioingeniería se ha utilizado para generar bibliotecas de plásmidos conteniendo variantes de un gen relevante que se insertan en una versión *knock-out* del subtipo de bacteria productora (30).

En el año 2005, la empresa PharmaMar, en colaboración con científicos de la Universidad de León, publicó la caracterización *knock-out* y la expresión heteróloga de los genes relacionados con la biosíntesis de la safracina B que, como se indicó anteriormente, es el producto de partida en la fabricación por semisíntesis de Yondelis® (31). Este grupo también han desarrollado la producción heteróloga del antitumoral marino tiocoralina (Figura 11) en varias especies de *Streptomyces* mediante ingeniería molecular del cluster NRPS, lo que permitirá la posible industrialización de este depsipéptido aislado del actinomiceto marino *Micromonospora marina*, que sólo puede cultivarse en agua de mar (32).

Estos son sólo algunos ejemplos del potencial de la bioingeniería para la fabricación industrial de productos naturales y de sus análogos.

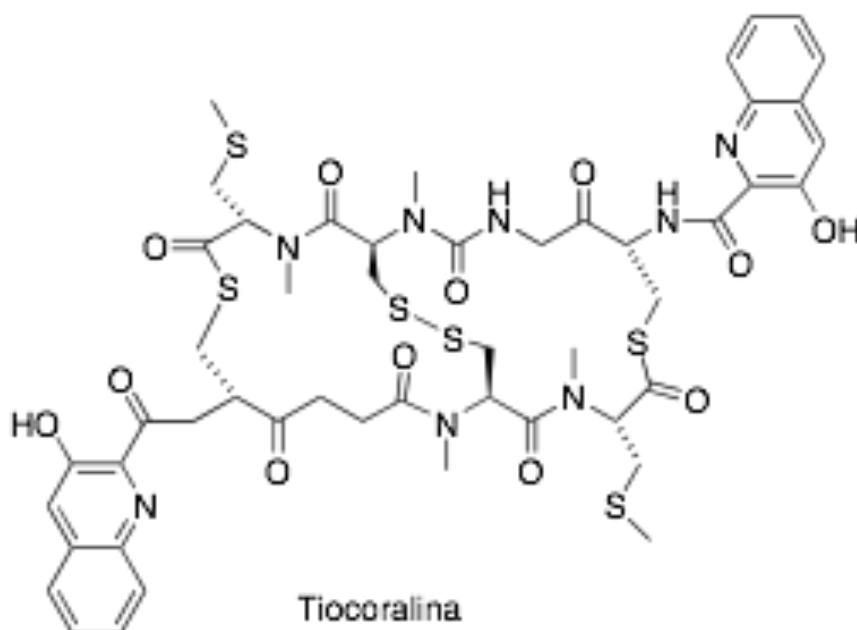


Figura 11.

8. REFERENCIAS

1. Lee, K.-H. (2010) Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. *J. Nat. Prod.* 73: 500-516.
2. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. (2009) Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev.* 109: 3012-3043.

3. Williams, O. H., Stone, M. J., Hauck, P. R. & Raham, S. R. (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.* 52: 1189-1208.
4. Kingston, D. G. & Newman, D. J. (2005) Natural products as drug leads: An old process or the new hope for drug discovery? *Drugs.* 8: 990-992.
5. a) Harvey, A. L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13: 894-901. b) Ganesan, A. (2008) The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 306-317.
6. Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.
7. Kingston, D. G. I. (2009) Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *J. Nat. Prod.* 72: 507-515.
8. Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (2008) Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Ed. Elsevier B. V. Cap. 8, pág. 229-249.
9. Bochart, J. K. (1999) Combinatorial biosynthesis: panning for pharmaceutical gold. *Modern Drug Discovery.* 2: 22-29.
10. a) Paterson, I. & Anderson, E. A. (2005) The Renaissance of natural Products as Drug Candidates. *Science.* 310: 451-453. b) Koehn, F. E. & Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 206-220. c) McChesney, J. D., Venkataraman, S. K. & Henri, J. T. (2007) Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochem.* 68: 2015-2022.
11. Rathore, D., Janil, D., Nagarkattil, R. & Kumar, S. (2006) Heme detoxification and antimalarial drugs – Known mechanisms and future prospects. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.* 3: 153-158.
12. Nicolaou, K. C. & Guy, R. K. (1995) The Conquest of Taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34: 2079-2090.
13. Roberts, R. M. (1989) Serendipity: Accidental Discoveries in Science. Wiley, New York.
14. Avendaño, C. (2005) La innovación farmacéutica. Comentarios sobre tres noticias. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 873-904.
15. Shu, Y.-Z. (1998) Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Nat. Prod.* 61: 1053-1071.
16. Dancik, V., Seiler, K. P., Young, D. W., Schreiber, S. L. & Clemons, P. A. (2010) Distinct Biological Network Properties between the Targets of Natural Products and Disease Genes. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 9259-9261.
17. Morton, D., Leach, S., Cordier, Ch., Warriner, S. & Nelson, A. (2008) Synthesis of Natural-Product-Like Molecules with Over Eighty Distinct Scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 48: 104-109.
18. a) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23: 3-25. b) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 3-26.
19. Buckingham, J. (2001) Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Chapman & Hall, London.
20. López, S. N., Ramallo, I. A., González, M., Zacchino, S. A. & Burlan, R. L. (2007) Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *PNAS.* 104: 441-444.
21. a) Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* 67: 1216-1238. b) Martínez, A. (2007) Marine-derived drugs in neurology. *Current Opin. Investig. Drugs.* 8: 525-530.
22. Glaser, K. B. & Mayer, A. M. S. (2009) A Renaissance in Marine Pharmacology: From Preclinical Curiosity to Clinical Reality. *Biochem. Pharmacol.* 78: 440-448.
23. Skov, M. J., Beck, J. C., de Kater, A. W. & Shopp, G. M. (2007) Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. *Int. J. Toxicol.* 26: 411-421.
24. Cuevas, C., Pérez, M., Martín, M. J., Chicharro, J. L., Fernández-Rivas, C., Flores, M., Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., Calle, F. de la, García, J., Polanco, C., Rodríguez, I. & Manzanares, I. (2000) Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phtalascidin Pt-650 from cyanosafracin B. *Org. Lett.* 2: 2545-2548.
25. De la Calle, F. (2007) Fármacos de Origen Marino. *Treballs de la SCB.* 58: 141-155.
26. Nagle, D. G., Zhou, Y., Mora, F., Mohammed, K. A. & Kim, Y. (2004) Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. *Curr. Med. Chem.* 11: 1725-1756.

27. Kelland, L. R., Sharp, S. Y., Rogers, P. M., Myers, T. G. & Workman, P. (1999) DT-Diaphorase Expression and Tumor Cell Sensitivity to 17-Allylamino,17-demethoxygeldanamycin, an Inhibitor of Heat Shock Protein 90. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1940-1949.
 28. Sánchez, C., Méndez, C. & Salas, J. A. (2006) Engineering biosynthetic pathways to generate antitumor indolocarbazole derivatives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 560-568.
 29. Van Kraaij, C., De Vos, W. M., Siezen, R. J. O. & Kuipers, P. (1999) Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* 16: 575-587.
 30. Cortés, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. & Leadlay, P. F. (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature.* 348: 176-178.
 31. Velasco, A., Acebo, P., Gomez, A., Schleissner, C., Rodríguez, P., Aparicio, T., Conde, S., Muñoz, R., Calle, F. de la, García, J. L. & Sanchez-Puelles, J. M. (2005) Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *pseudomonas fluorescens* A2-2: Designing new cytotoxic compounds. *Mol. Microbiol.* 56: 144-154.
 32. Lombó, F., Velasco, A., Castro, A., Calle, F. de la, Braña, A. F., Sanchez-Puelles, J. M., Méndez, C. & Salas, J. A. (2006) Deciphering the biosíntesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine *Actinomycete* and Its expression in two *Streptomyces* species. *Chem. Bio. Chem.* 7: 366-378.
-

Nanotecnología farmacéutica de los siARN

José Luis Vila Jato

Académico de Número de la RANF.

Recibido el 10 de marzo de 2011.

e-mail: vilajato@vilajato.e.telefonica.net

RESUMEN

El silenciamiento de genes por medio de siARN constituye actualmente una estrategia terapéutica que está siendo evaluada en diversos ensayos clínicos. La presente revisión se centra particularmente en las estrategias no víricas de liberación in vivo de los siARN ya que ello constituye uno de los más importantes problemas a resolver. Por otra parte es necesario comprender la genocompatibilidad/toxicogenética de los sistemas de liberación para poderlos seleccionar adecuadamente de acuerdo con la aplicación terapéutica deseada.

Palabras clave: Pequeños ARN de interferencia; terapia génica; vectores no víricos; polímeros catiónicos; sistemas lipídicos.

ABSTRACT

siRNA pharmaceutical nanotechnology

Gene silencing using small interfering RNA (siRNA) is a technology that is now being evaluated in clinical trials as a potentially novel therapeutic strategy. This article provides an overview of the major pharmaceutical challenges facing siRNA therapeutics, focusing on the non-viral delivery strategies in vivo for synthetic siRNA, as this remains one of the most important issues to be resolved. It is also important to understand the genocompatibility/toxicogenomics of siRNA delivery reagents in terms of their impact on gene-silencing activity and selectivity because this information is essential for the selection of optimally acting siRNA delivery systems for the many proposed applications of RNA interference.

Key words: Small interfering RNA; gene therapy; non-viral vectors; cationic polymers; lipid-based systems.

1. INTRODUCCIÓN

El nuevo milenio se ha iniciado con el genoma humano ya secuenciado, lo que ha propiciado la construcción de nuevas bases de datos sobre las que previsiblemente se apoyará la medicina del futuro. Paralelamente, se han venido descubriendo y analizando con detalle los mecanismos moleculares y celulares de actuación de multitud de productos génicos cuya alteración conduce a la aparición de diferentes enfermedades. Todos estos nuevos conocimientos están revolucionando el desarrollo de sistemas terapéuticos encaminados a desarrollar nuevos tratamientos y mejorar los métodos farmacológicos tradicionales. La Figura 1, en su parte superior, establece cronológicamente los aspectos más sobresalientes de los nanosistemas farmacéuticos para señalar, en la parte inferior, como esos aspectos han influido en la aparición de nanomedicinas en el mercado o en fase de ensayos clínicos.

Dentro de estas nuevas modalidades terapéuticas podemos englobar el empleo de los fármacos basados en material genético. Dicho empleo es la base de lo que tradicionalmente se conoce como terapia génica, que consiste en una técnica terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente humano para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. Dentro de esta denominación también se incluyen la utilización de los pequeños ARN de interferencia (siARN), oligodeoxinucleótidos (ODN) y ribozimas, que se utilizan para suprimir la traducción de un ARN mensajero determinado. De esta manera podemos utilizar la terapia génica como estrategia para inducir la expresión de una proteína con una determinada actividad terapéutica o, por el contrario, suprimir la expresión aberrante de una proteína cuando ésta es el origen de la patología. En mi opinión este último aspecto es el que está suscitando mayor interés, particularmente desde la introducción en terapéutica de los llamados pequeños ARN de interferencia ya que su potencia, comparada con oligonucleótidos, es del orden de 10 a 100 veces mayor.

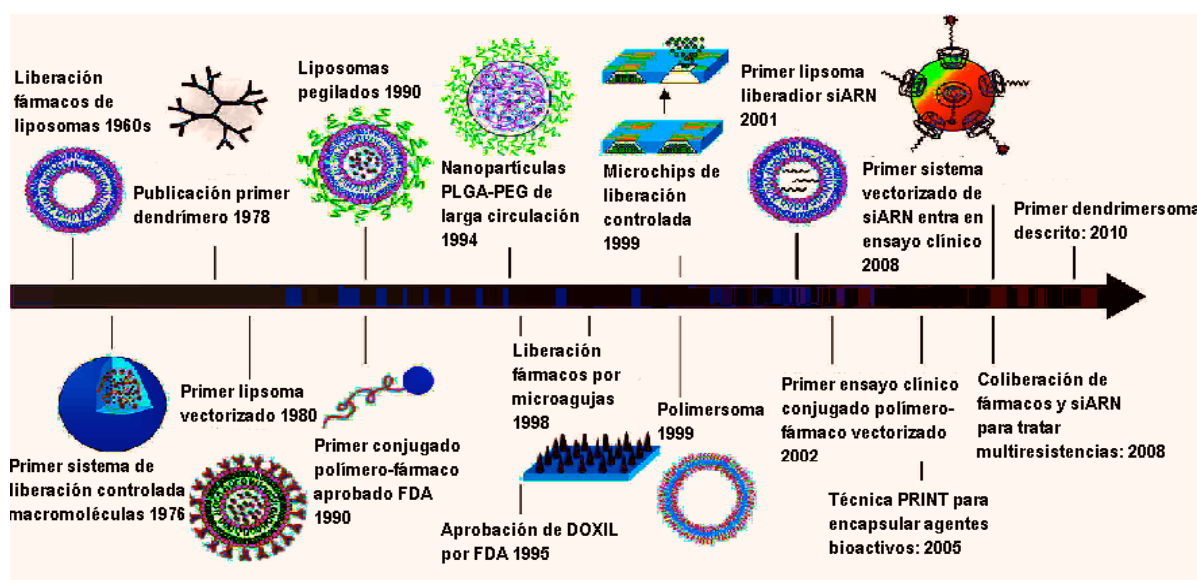


Figura 1. Aspectos más sobresalientes en el desarrollo de la nanotecnología farmacéutica y sus aplicaciones terapéuticas.

Desde su descubrimiento en plantas como un mecanismo de defensa frente a infecciones víricas y, posteriormente en células de mamíferos (1), el uso de los siARN se ha convertido en una poderosa herramienta ya que una degradación específica de m-ARN provoca el silenciamiento de la expresión de genes y sus aplicaciones terapéuticas en diversas patologías como se pone de manifiesto en los diversos ensayos clínicos que se recogen en la Tabla 1.

Otras áreas terapéuticas en fase preclínica son: Hepatitis C (24, 25), terapias antivirales como el silenciamiento de los receptores y correceptores del HIV en el huésped (26-28), tratamientos para enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington (29), Alzheimer (30), etc.

Tabla 1. Ensayos clínicos que se están realizando con diversos siARN (Febrero 2011).

Patología	Referencia
Degeneración macular por edad y diabética	2-6
Virus sincitial respiratorio	7, 8
Cáncer	9-16
Hipercolesterolemia	17
Cirugía mayor cardiovascular	18
Trasplante renal	19
Paquioniquia congénita	20
Hepatitis B crónica	21, 22
Glaucoma	23

Desde el punto de vista regulatorio los fármacos basados en siARN se engloban dentro de la categoría de fármaco (drug) porque presentan una estructura química definida y fácilmente analizables tras su síntesis. Por el contrario, la gran mayoría de productos utilizados en terapia génica, incluyendo plásmidos, se encuadran en la categoría de productos biológicos por lo que su proceso de producción debe garantizar un estricto control de la pureza, potencia y seguridad. Todo ello, unido a la eficacia y especificidad de los siARN, es lo que determina que, a una velocidad sin precedentes, se estén desarrollando nuevas terapéuticas a base de siARN como se demuestra que desde 2001 hasta la actualidad aparezcan en PubMed 7.137 referencias para siRNA therapeutics (dato Febrero 2011).

Tal como se recoge en la Figura 2 la introducción de ARN de doble hebra (dsRNA, del inglés *doublestranded RNA*) en una célula u organismo inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del ARN mensajero (ARNm) de secuencia homóloga al dsARN originalmente introducido. La primera fase del complejo de señalización es llevada a cabo por una endonucleasa tipo 3 denominada Dicer la cual fragmenta el dsARN en porciones de 21-23 nucleótidos de longitud, los denominados pequeños ARN de interferencia o siRNA

(del inglés *small interfering RNA*). Estos siARN son posteriormente incorporados a un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*). Este complejo enzimático RISC contiene una helicasa, la cual se encarga de separar las dos hebras del siARN. Posteriormente, la hebra sentido (del inglés *sense strand*) del siRNA es degradada, quedándose unida la hebra antisentido que será la que actúe como guía para seleccionar su diana, es decir, la molécula de ARNm complementario que va a ser degradada. Finalmente la acción endonucleasa de RISC cortará el mRNA complementario inhibiendo de este modo su traducción. Otra posibilidad de inhibir la síntesis de un ARNm específico mediante el mecanismo de RNA interferente es utilizar vectores basados en ADN que son capaces de expresar pequeños ARN en forma de horquilla (shRNA, del inglés *small hairpin RNA*) que en el interior celular son procesados a siARN por la enzima Dicer. Sin embargo actualmente se usan los siARN en lugar de las largas cadenas shARN porque en ciertas patologías (ciertos tipos de tumores), los niveles de Dicer son bajos y ello provoca escasa interferencia, así como un posible aumento de la toxicidad, especialmente a nivel hepático.

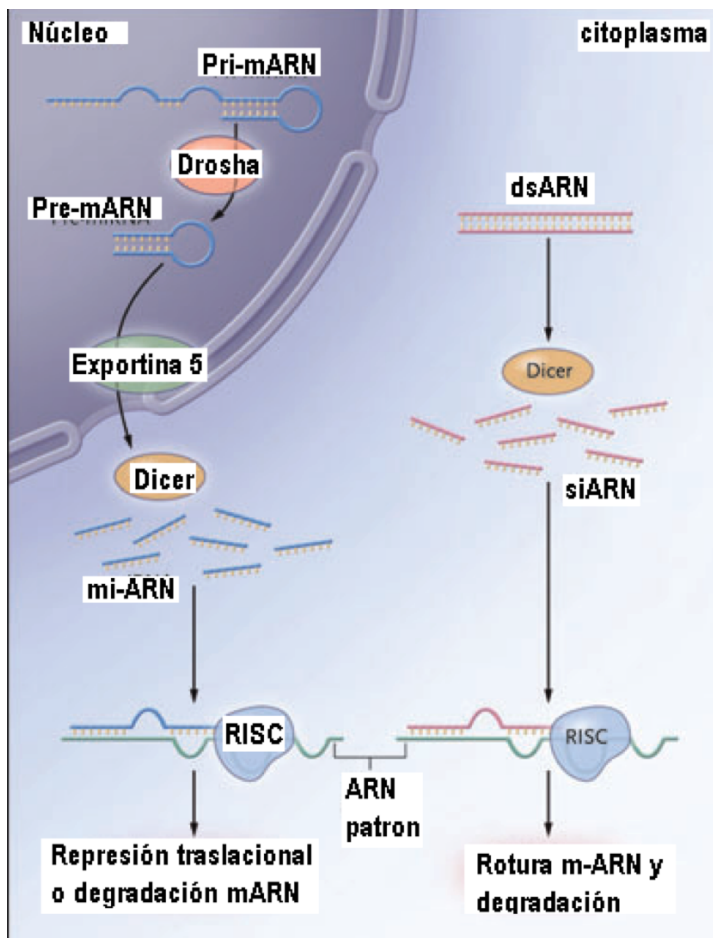


Figura 2. Procesos de interferencia de ARN en células de mamíferos.

Un área clave de investigación en el uso de RNAi en aplicaciones clínicas es el desarrollo de un método de administración seguro (31), que hasta el momento implica sobre todo el uso de sistemas de vectores virales similares a los que se utilizan en terapia génica, aunque también se utilizan otros mecanismos como

aerosoles, si bien éstos han demostrado no tener tanta eficacia. A pesar de la proliferación de estudios en cultivos celulares para medicamentos basados en ARNi, existen algunas preocupaciones en relación a su seguridad, especialmente debido a los posibles efectos off-target (efectos inespecíficos), en los que un gen con una secuencia similar al gen diana es también silenciado. Una fuente primaria de efectos off-target se deriva de la región “semilla” (nucleótidos 2-8) del siARN antisentido, una región crítica para la identificación del gen diana (32-34).

La utilización clínica de los siARN requiere un complejo proceso en el que se pueden diferenciar una serie de etapas clave, tal como se recoge en la Figura 3. El siARN debe ser diseñado de tal forma que sea accesible para el m-ARN diana ya que no todas las secuencias complementarias son efectivas para un determinado m-ARN. Por ello se necesita recurrir a algoritmos computacionales y test empíricos para desarrollar potentes siARN. Los efectos off-targeted pueden producirse si existen secuencias homólogas, especialmente en 3'UTR, con otros m-ARN diferentes del diana o bien a través de la estimulación de la respuesta inmune ya que ciertos siARN conteniendo secuencias ricas en GU (por ejemplo UGUGU) estimulan, vía receptores tipo toll (TLRs), la liberación de interferon α , IL-6 y TNF α pero, puesto que no se conocen todos los factores estimulantes de la inmunidad, se necesita realizar test empíricos en el sistema diana para identificar siARN potentes y específicos.

La segunda etapa crítica en la utilización de un siARN es la mejora de su estabilidad química. Los siARN son rápidamente degradados por la acción de nucleasas por lo que su semivida es muy corta (pocos minutos). Es por ello por lo que se necesita realizar modificaciones químicas que pueden afectar a la base nitrogenada o azúcar del siARN y que no solo aumentan su estabilidad química sino también mejoren su captura celular (35-37). Ello se traduce en una estabilidad durante horas y un silenciamiento del gen durante días en conjunción con un sistema de liberación apropiado. Por otra parte, las modificaciones químicas también pueden reducir los efectos off-targeted y modificar la estabilidad térmica en varias zonas de secuencias críticas.

Debido a la hidrólisis de la unión fosfodiéster, la protección de grupos 2'hidroxilo es ampliamente utilizada para mejorar la estabilidad de los siARN; estas modificaciones incluyen: 2'O-metil, 2'fluor y 2' O (metoxietil) (38), tal como se recoge en la Figura 4.

Estas modificaciones pueden ser llevadas a cabo de forma uniforme o bien en combinación de varias de ellas; pueden afectar a varias o a todas las unidades mientras que otras no pueden realizarse en algunas posiciones.

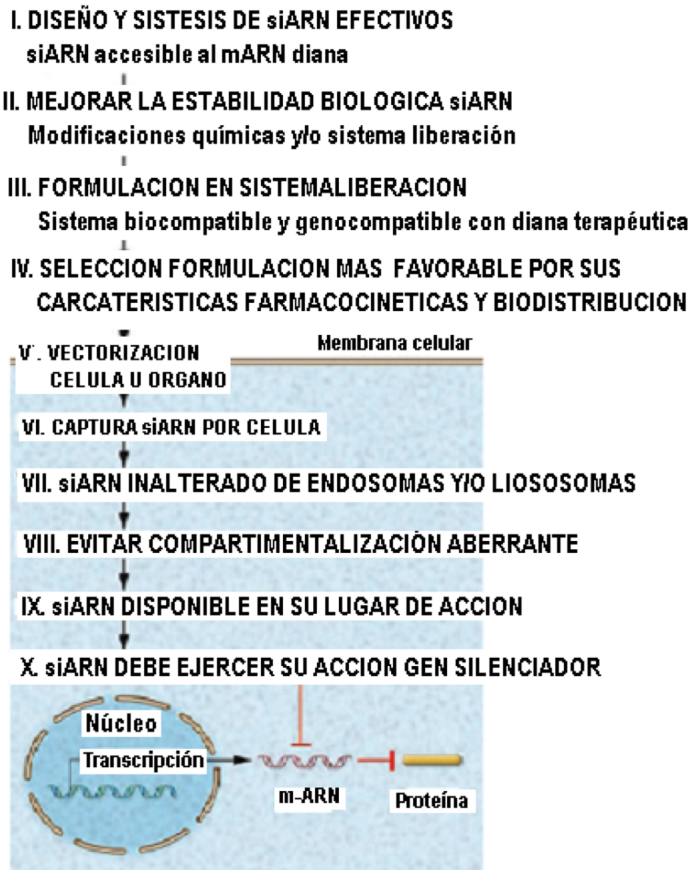


Figura 3. Etapas clave para la utilización clínica de los siARN.

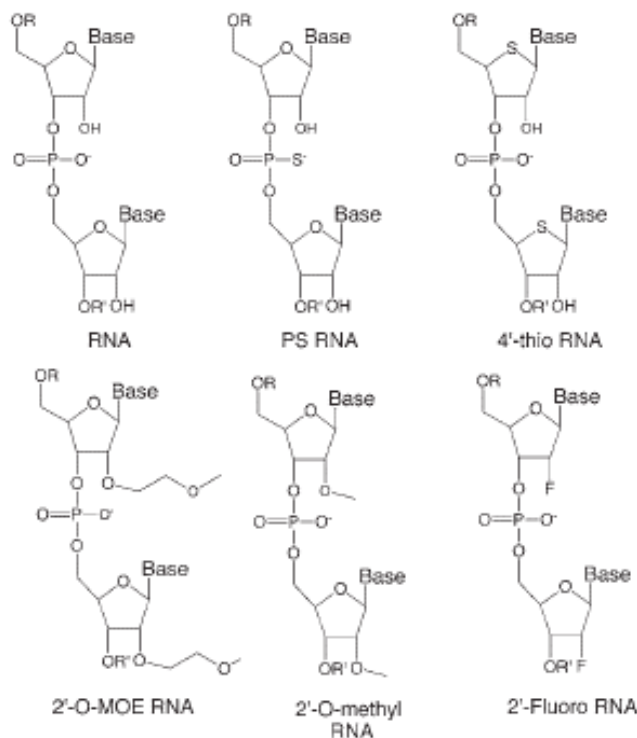


Figura 4. Algunas de las modificaciones químicas realizadas en los siARN.

Uniones fosforotionato: La sustitución de un átomo de oxígeno del enlace fosfato por un átomo de azufre da lugar a un enlace fosforotionato (PS). Esta idea ha surgido como consecuencia de haberla utilizado previamente en oligonucleótidos antisentido, entre ellos el Fomivirsén (Vitravene®). Diversos estudios han demostrado que siARN con enlaces fosforotionato siguen manteniendo la capacidad de silenciar secuencias diana (39) pero aquellos con enlaces alternantes en ambas cadenas muestran citotoxicidad lo que parece indicar que existe un límite de enlaces fosforotionato (40).

ARN modificados en 2': Se han desarrollado muchos ARN análogos en los que el grupo OH en la posición 2' de la ribosa es sustituido por 2-O-metil, 2'-O-metoxietil y 2' fluor. En todos ellos aumenta la estabilidad frente a las nucleasas y se incrementa la afinidad por las secuencias complementarias del ARN. Los grados de sustitución varían desde un nucleótido hasta la modificación total de los nucleótidos que constituyen las dos cadenas; igualmente la alternancia de sustituyentes 2'-O-metil y 2'F aumentan hasta 500 veces el silenciamiento con respecto al siARN sin modificar (41). Por otra parte la introducción de 2'-O-metilnucleótidos cerca del final de la cadena de ARN que es complementaria del mRNA diana reduce los efectos off-target lo cual abre un importante camino para reducir los efectos secundarios de los siARN (42).

4'tio: La sustitución del O de la ribosa por S da lugar a un aumento en la resistencia frente a las nucleasas y combinando esta sustitución con modificaciones en la posición 2' se produce un incremento de la potencia del siARN (43). Al igual que sucede en los oligonucleótidos antisentido la combinación de derivados 4'tio con nucleótidos PS, en los que aumenta la afinidad por la seroalbúmina y un incremento de su semivida (44), es posible que esta estrategia también pueda aplicarse en los siARN aunque no existen trabajos que avalen experimentalmente este hecho.

Otro tipo de modificaciones químicas se refieren a aquellas realizadas en el nucleótido terminal y que se conocen como siARN conjugados. Tal como se expone en la Figura 5 estas modificaciones se pueden hacer con péptido TAT, o péptidos fusógenos más simples como octaarginina, o penetratina, colesterol, PEG o aptámeros.

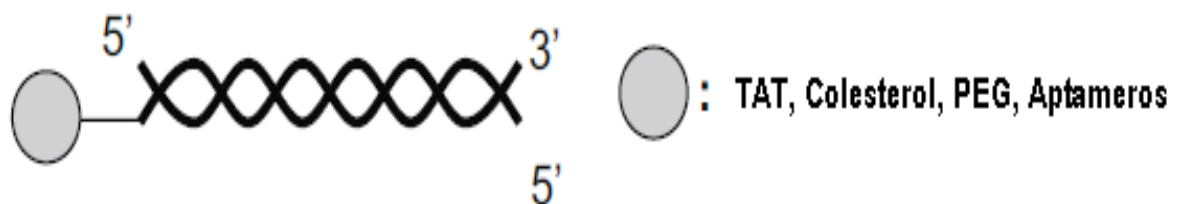


Figura 5. Conjugados de siARN.

La conjugación con el péptido TAT y péptidos fusógenos en siARN modificados permiten una rápida captura por parte de las células (45). Igualmente la conjugación con colesterol en siARN con enlaces fosforotionato y 2'-O-metil dan

lugar a conjugados con estabilidad frente a nucleasas mientras que el colesterol aumenta la unión a la seroalbúmina incrementando la biodistribución a varios órganos como hígado, corazón, riñón, pulmón y tejido adiposo al mismo tiempo que se mejora el paso a través de las membranas biológicas (46). La pegilación de macromoléculas biológicas y de ácidos nucleicos es una tecnología ampliamente utilizada para mejorar la solubilidad o reducir la citotoxicidad y es también utilizada en el caso de siARN. Por ejemplo Kim *y col.* (47) utilizan un siARN conjugado con PEG que interacciona electrostáticamente con PEI originándose espontáneamente micelas que contienen el complejo PEI-siARN en su interior y cadenas de PEG en el exterior. Estas micelas administradas en un modelo de tumor en ratón inhiben la expresión de VEGF sin que se observe, tras su administración i.v. o intratumoral, reacciones inflamatorias.

La conjugación de siARN con anticuerpos modificados es una técnica utilizada para conseguir una adecuada vectorización pero actualmente se prefiere utilizar aptámeros, no solo porque también se consigue una elevada selectividad y especificidad sino también porque pueden ser sintetizados químicamente. Chu *y col.* dan cuenta de la conjugación de un siARN, con un aptámero específico del antígeno de membrana de células tumorales de próstata, a través de una unión estreptavidina (48); más recientemente, y en esta misma línea, Dassie *y col.* utilizan un complejo del mismo aptámero específico unido a PEG y siARN observando un marcado descenso de los niveles del antígeno (49).

2. NANOSISTEMAS PARA LA LIBERACIÓN DE siARN

Para un futuro cada vez más próximo los vehículos estarán constituidos por nanopartículas, liposomas o micelas y contendrán, tal como se recoge en la Figura 6, elementos como cadenas de PEG o análogos que permitan una larga semivida del sistema en fluidos biológicos, moléculas capaces de reconocer receptores de la superficie de las células y elementos que favorezcan la internalización del sistema.

La inclusión de siARN en nanovehículos es considerada como la etapa clave para su eficiente utilización. Aunque los vectores virales son altamente eficientes como sistemas de liberación y transfección su uso en la práctica clínica presenta serios problemas. Ello ha dado lugar a un creciente desarrollo de sistemas no virales que permitan solventar los problemas que plantean los siARN derivados de su peso molecular (del orden de 13 kDa) y su fuerte carga aniónica (aproximadamente 40 cargas negativas fosfato) que origina una repulsión electrostática con la carga negativa de la membrana celular por lo que se necesitan sistemas de liberación que faciliten el acceso intracelular y los protejan durante su tráfico intracelular hasta alcanzar su diana. Los nanovehículos utilizados pueden ser liposomas, nanopartículas micelas, dendrímeros, constituidos por lípidos catiónicos (lipoplexes), o péptidos catiónicos penetradores. Todos ellos presentan como característica común el poseer un carácter catiónico lo que permite una interacción iónica con el carácter polianiónico de los siARN. Por otra parte la carga positiva del sistema también facilita su interacción con la carga negativa de las membranas celulares y su transporte a través de ellas vía endocitosis y/o macropinocitosis.

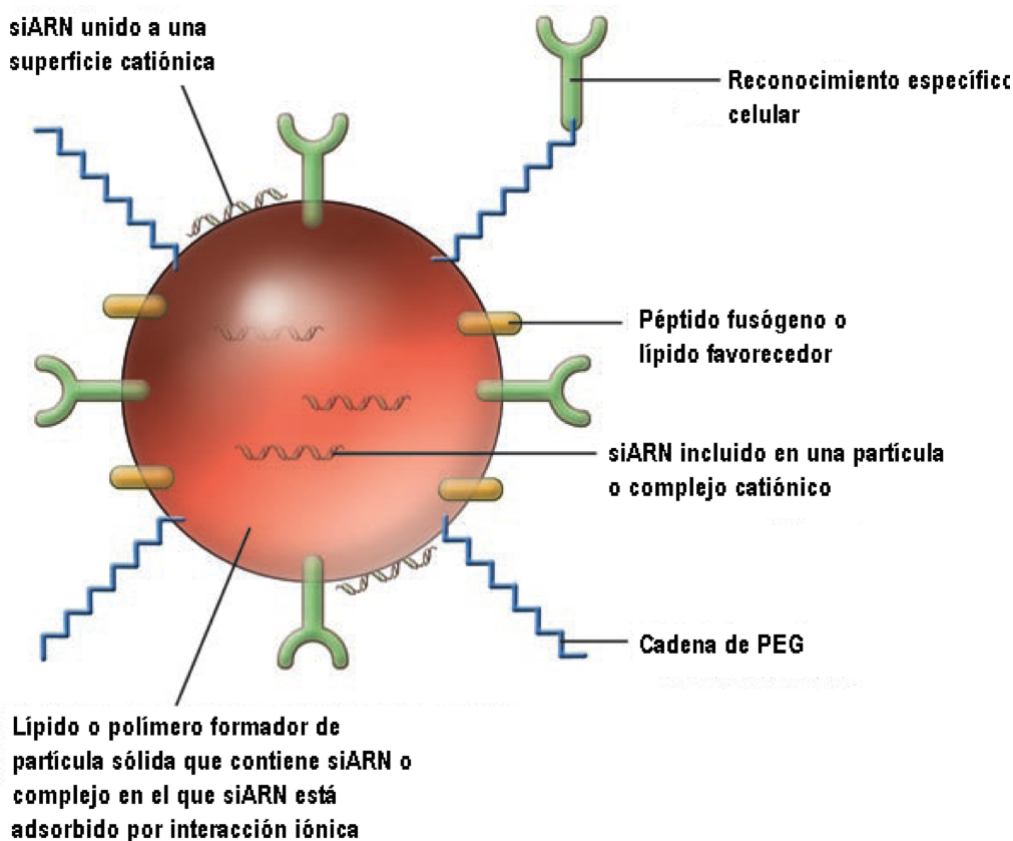


Figura 6. Componentes que forman parte de nanosistemas conteniendo siARN.

La elevada densidad de carga de estos polímeros permite que se unan y condensen con los siARN al mismo tiempo que se liberen de los endosomas por el efecto conocido como “esponja de protones”. De todos estos polímeros los más ampliamente utilizados son las polietileniminas (PEI) de diferente peso molecular y ramificación (Figura 7).

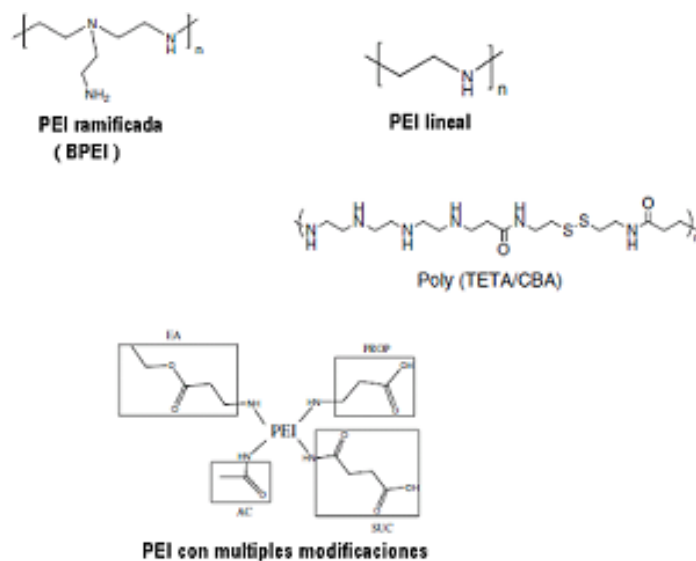


Figura 7. Estructura química de las diferentes PEI y sus modificaciones.

3. POLÍMEROS CATIONICOS

Una amplia variedad de polímeros catiónicos, tanto naturales como sintéticos, han sido utilizados (50, 51) si bien su eficacia de transfección sigue estando diversos órdenes de magnitud por debajo de la eficacia de los vectores virales por lo que se están desarrollando diferentes estrategias para conseguir polímeros catiónicos más eficaces.

Un aspecto que ha sido objeto de numerosos trabajos es el relacionado con el peso molecular del polímero, grado de ramificación, carga de siARN y su efecto sobre la citotoxicidad y eficiencia de transfección. En este sentido Grayson *y col.* (52) han sido los primeros en poner de manifiesto que los mejores resultados se obtienen con PEI ramificada de 25 K, con una relación N/P (nitrógeno de PEI y P del grupo fosfato del siARN) entre 6 y 8 con 200 nM de siARN. Además debe tenerse en cuenta el tamaño de la nanopartícula formada (< 100 nm) así como su potencial z.

PEI ramificadas de elevado peso molecular (25 a 800 kD) muestran una elevada capacidad de transfección pero también una alta citotoxicidad; una aproximación para utilizar PEI ramificadas de bajo peso molecular (800 Da), con baja citotoxicidad, pero con elevada capacidad de transfección consiste en el empleo de PEI reticulados vía enlaces biodegradables. La reticulación puede hacerse con PEG de peso molecular del orden de 2.000 Da habiéndose encontrado buenas capacidades de transfección (53-55).

Otras reticulaciones interesantes son las que se producen entre PEI y ácido oleico o esteárico lo que incrementa la hidrofobicidad del nuevo polímero y una mayor capacidad de condensación del siARN (56) con aminoácidos como la tirosina (57) así como las producidas con ácido succínico o propiónico con los que, manteniendo una elevada capacidad de condensación y de transfección, presentan sin embargo una baja citotoxicidad (58).

Puesto que los siARN actúan a nivel citoplasmático los polímeros reductores con enlaces disulfuro se presentan como una alternativa favorable dada la rapidez con que se liberan los siARN a nivel del citoplasma. Un ejemplo de estos polímeros lo constituye un copolímero de trietilentetramina y cistamina bis acrilamida (TETA/CBA) (59) utilizado para vectorizar un siARN frente a VEGF; la inhibición de este factor ha sido más elevada que la que se obtiene con PEI lineal de 25 kD. Otra formulación en la que se emplean polímeros reductores está constituida por un siARN derivatizado con hexilamina y posteriormente se une covalentemente con succinimidil 3 (2 piridilditio) propionato (SPDP), como agente reticulante, y metoxipolietilenglicol (5.000 Da) con grupos sulfidrilos formándose el complejo siARN-s-s-PEG que por su carácter aniónico se fija a PEI ramificada (25 kD) y da lugar a la formación de un complejo micelar polielectrolítico (60).

Otro polímero catiónico conteniendo ciclodextrinas (Figura 8) es capaz de condensar siARN y dar lugar a nanopartículas de tamaño 50 nm; este polímero constituye la base de la formulación de siARN utilizada en el ensayo clínico para el tratamiento de tumores sólidos (11) la cual está constituida por la ciclodextrina polimérica en cuyas cavidades se aloja adamantano que sirve de enlace para la fijación de cadenas de PEG sobre las que se fija transferrina realizándose posteriormente la condensación del siARN. El grado de protección que presta frente a la acción de las nucleasas hace innecesario realizar modificaciones

químicas en el siARN al mismo tiempo que se consigue una disminución de los efectos inmunoestimulantes (61). Este mismo tipo de polímero es utilizado para obtener nanopartículas conteniendo camptotecina en una formulación (IT101) que se encuentra en fase preclínica muy avanzada (62).

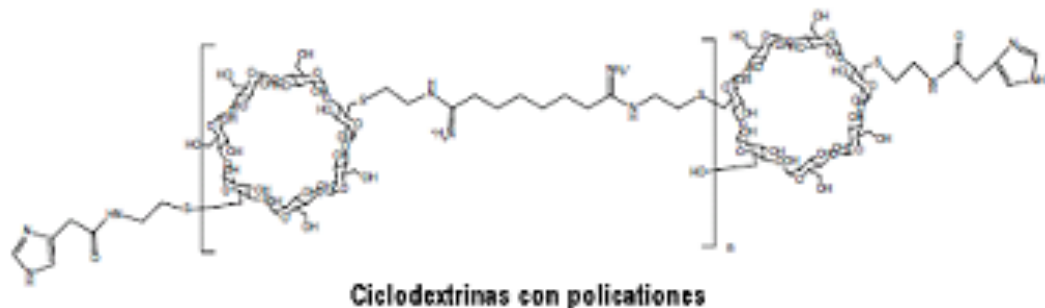


Figura 8. Ciclodextrinas policatiónicas.

Otro polímero catiónico que está siendo objeto de un creciente interés es el quitosano (Figura 9) y sus derivados (63-65) que presentan un carácter biodegradable, bien tolerado, poseer propiedades bioadhesivas así como aumentar la permeabilidad a través de los epitelios si bien su capacidad de transfección es baja para aplicaciones clínicas. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la capacidad de transfección depende de numerosos factores como peso molecular, grado de deacetilación, relación de carga siARN/quitosano, pH, técnica de preparación de las nanopartículas (66). El peso molecular del quitosano tiene una importancia grande tanto en la estabilidad del complejo con siARN como en el tamaño de la partícula formada; según Liu y *col.* (59) el peso molecular óptimo está comprendido entre 65-170 kDa lo que corresponde a 5-10 veces el peso molecular de siARN (13,4 kDa). Conjuntamente con el peso molecular se relaciona el grado de desacetilación del quitosano el cual, para moléculas de siARN debe ser elevado (del orden del 80%) para conseguir un complejo estable.



Figura 9. Obtención del quitosano a partir de la quitina.

El quitosano puede utilizarse en forma de diversas sales como clorhidrato, glutamato, lactato, acetato, etc. Katas y Alpar (67) encuentran una mayor eficiencia de carga y capacidad de transfección utilizando el glutamato.

Finalmente la relación N/P (N: grupos amino del quitosano y P: grupos fosfato de siARN) y el método de preparación tienen importancia en el tamaño de la nanopartícula, estabilidad del siARN así como en su internalización. Según

Howard *y col.* (68) los mejores resultados se obtienen con relaciones entre 50 y 150 mientras que Raviña (69) recomienda utilizar la técnica de gelificación iónica por ser una técnica que permite obtener nanopartículas estables en unas condiciones extremadamente suaves.

Se están realizando numerosas modificaciones en la molécula del quitosano para mejorar su capacidad de transfección; entre estas modificaciones caben destacar el quitosano pegilado (70) del cual puede obtenerse fácilmente nanopartículas por la técnica de gelificación iónica que se recoge en la Figura 10, trimetilquitosano pegilado (70), quitosano-PEI (71) etc. así como mezclas de quitosano pegilado y ácido hialurónico (72).

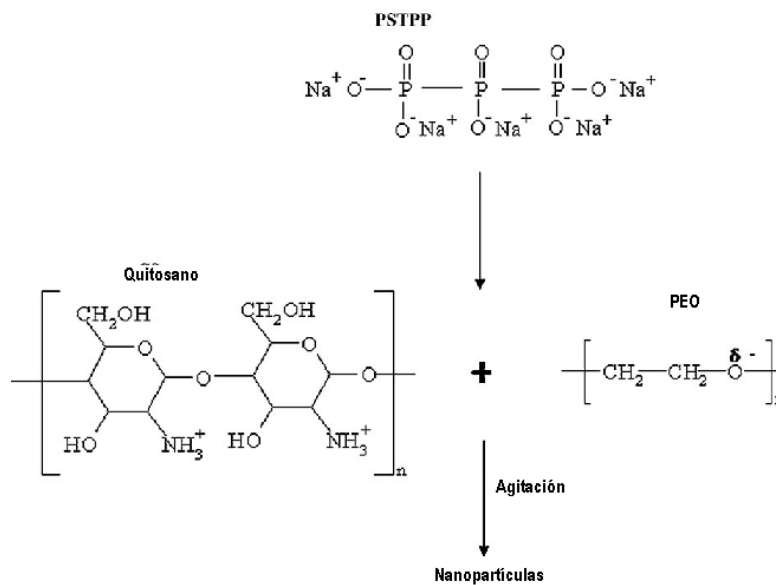


Figura 10. Obtención por gelificación iónica de nanopartículas de quitosano-PEO (PSTPP: Tripolifosfato pentasódico).

Unos pocos estudios han demostrado que el pirofosfato de tiamina (TPP) o la tiamina difosfato (Figura 11) constituyen buenos agentes reticulantes para obtener nanopartículas de quitosano ya que son hidrosolubles y menos tóxicos que el tripolifosfato. Rojanarata *y col.* (73) establecen que los grupos fosfato de TPP forman una sal hidrosoluble con los grupos amino de quitosano protonizados y que éstos complejan con siARN y aumentan su eficiencia de transfección. La eficiencia de los complejos quitosano-TPP/siARN aumenta hasta alcanzar un 70-73% al incrementarse la relación N/P hasta 80 cuando el peso molecular del quitosano está comprendido entre 20 y 45 kDa. Sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos realizados, no se han podido establecer las condiciones óptimas de los parámetros: peso molcul, grado de desacetilación, relacion N/P, pH y modificaciones químicas para alcanzar un rango útil en la eficiencia de transfección.

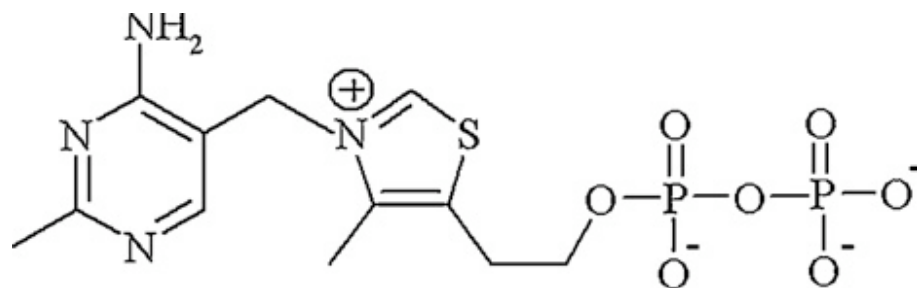


Figura 11. Pirofosfato de tiamina (TPP).

Otra modificación química del quitosano es la propuesta por Ghosn *y col.* (74) consistente en la introducción de grupos imidazol vía carbodiimida (Figura 12). Este sistema presenta un buen escape endosomal, disociación endoplasmática del siARN y buena capacidad de transfección *in vitro*.

Lee *y col.* (75) proponen la utilización del quitosano unido a restos de alginato o poliguluronato (Figura 13) el cual es biocompatible, no tóxico y puede emplearse como agente de reticulación formando nanopartículas estables obtenidas por coacervación.

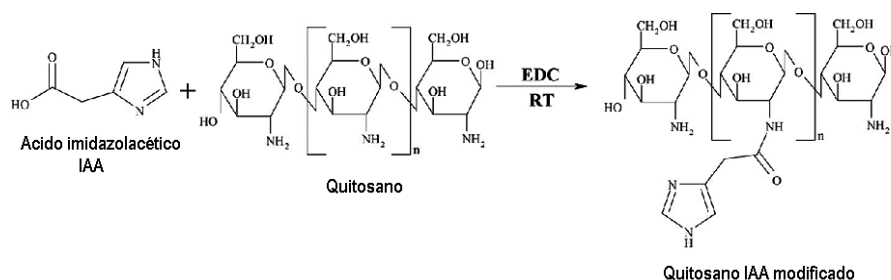


Figura 12. Estructura química del quitosano imidazol acético.

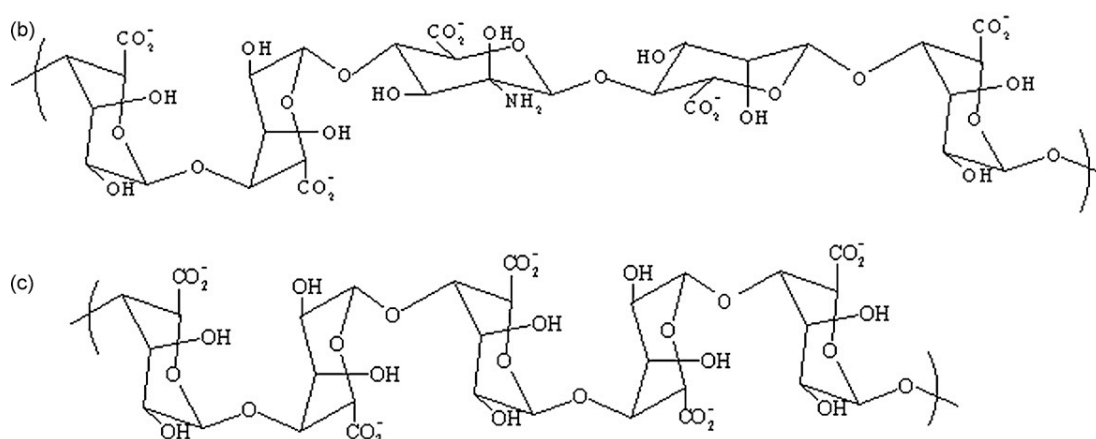


Figura 13. Estructura química del quitosano alginato (b) y quitosano poliguluronato (c).

En el mencionado trabajo se utiliza un quitosano de peso molecular 470 kDa, grado de desacetilación del 86% y alginato de peso molecular 200 kDa.

Jere y col. (76) han obtenido un copolímero quitosano-polietilenimina obtenido según se recoge en la Figura 14. El quitosano utilizado tiene un peso molecular de 100 kDa y un grado de desacetilación del 88% mientras que la polietilenimina es de bajo peso molecular (1,8 kDa). Con este copolímero se pueden preparar nanopartículas estables de unos 150 nm. Los estudios realizados in vitro en células A549 muestran un silenciamiento de la proteína oncogen Akt1.

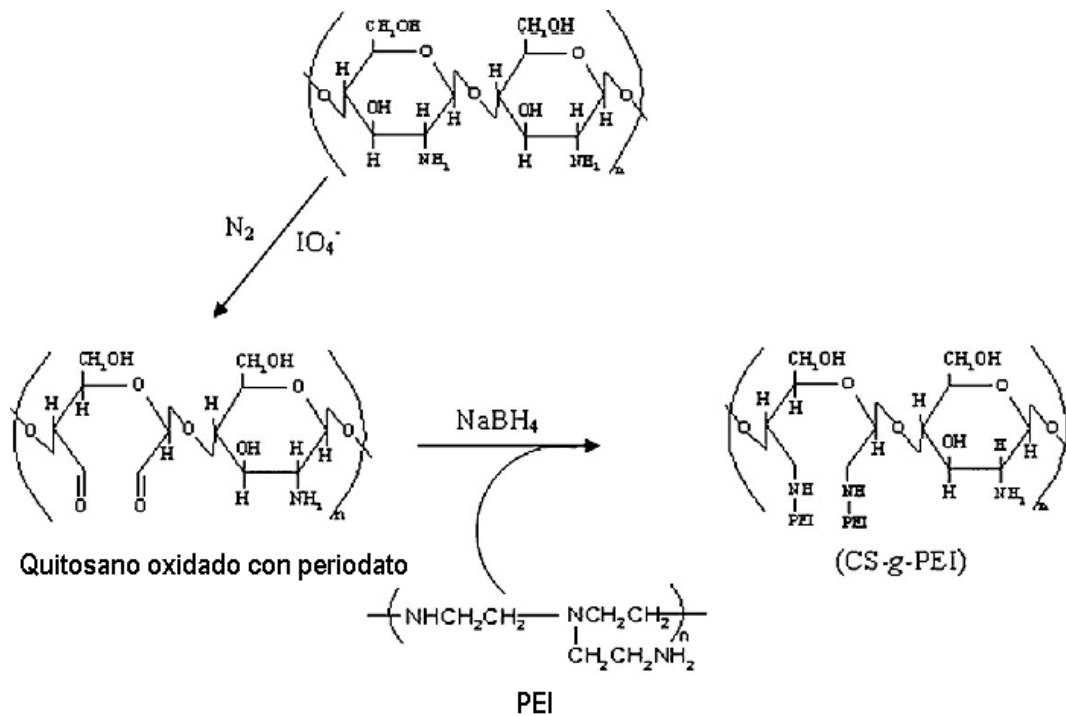


Figura 14. Síntesis del quitosano-Polietilenimina.

Basándose en estos resultados Jiang y col. (77) han preparado un copolímero de quitosano polietilenimina al que se le incorpora ácido fólico como vectorización de células cancerosas (Figura 15). Las nanopartículas tienen un tamaño de 80 nm y un potencial z de + 18 mV cuando la relación N/P es de 14. La administración vía pulmonar de estas nanopartículas suprimen la tumorigénesis en ratones con cáncer pulmonar inducido por uretano a través de la proteína Akt1.

De los trabajos publicados se puede concluir que el quitosano y sus derivados constituyen prometedores polímeros para la liberación de siARN por su carácter no tóxico, biodegradables, y poco inmunogénicos. Sin embargo su utilización depende de factores como peso molecular, grado desacetilación, relación quitosano/siARN (N/P), pH, tipo y naturaleza del derivados o agente utilizado en la reticulación. Un peso molecular bajo conduce a pequeñas nanopartículas (100 nm) y una moderada carga superficial positiva así como una relación N/P alta favorece un eficiente grado de transfección (78).

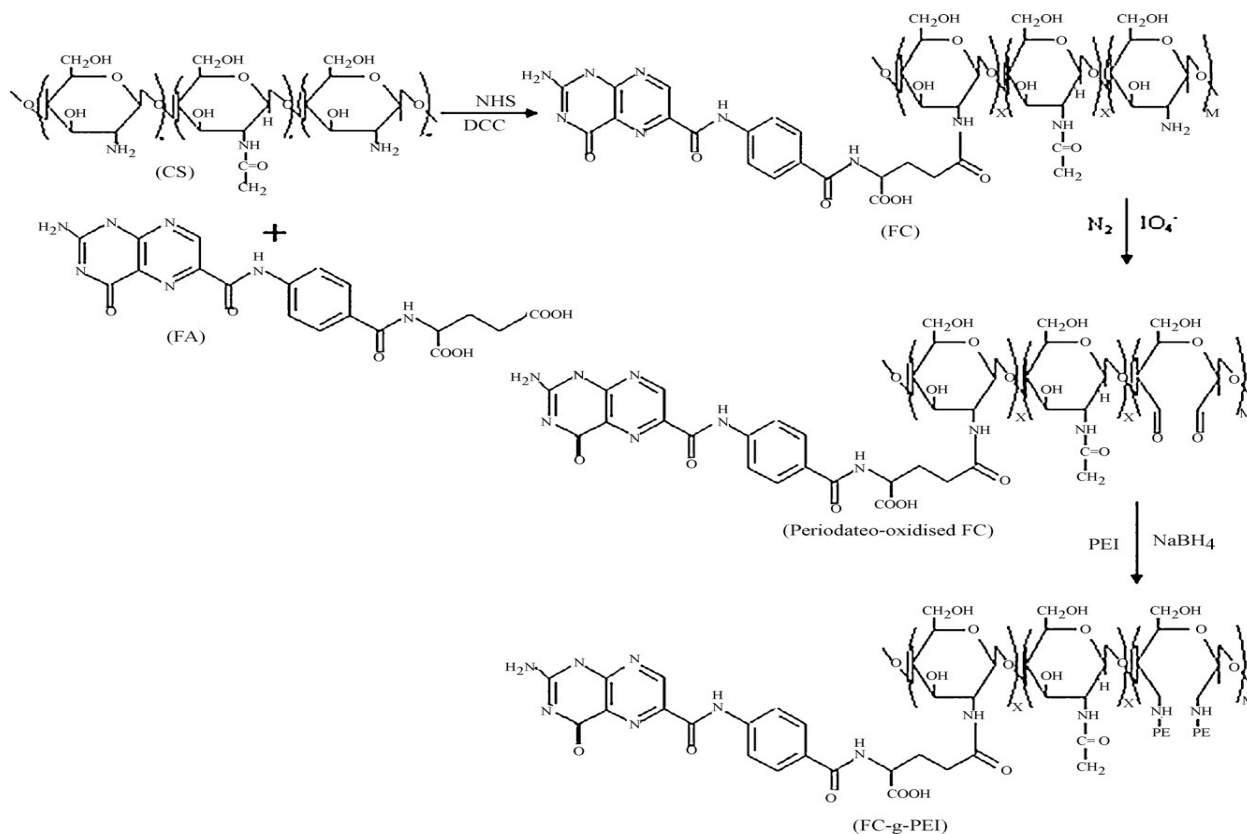


Figura 15. Obtención del quitosano-PEI con ácido fólico.

El atelocolágeno, con un peso molecular de 300 kDa y de carácter catiónico, es un derivado del colágeno tipo I procedente de la dermis de ternero altamente purificado por tratamiento con pepsina. El colágeno posee una secuencia de aminoácidos denominada telopéptido en el N y C terminal que confiere antigenicidad. El tratamiento con pepsina elimina los telopéptidos por lo que el atelocolágeno posee baja inmunogenicidad y clínicamente se emplea como hemostático, prótesis venosas, substitutivo de cartílago óseo, etc. Minakuchi y *col.* (79) dan cuenta de un procedimiento para formar complejos con siARN consistente en disolver el atelocolágeno en PBS pH = 7,4 y mezclar con la solución de siARN, agitando durante 20 minutos a 4 °C, manteniéndose el complejo a 4 °C durante 16 horas antes de su utilización. El complejo con siARN es soluble a temperatura ambiente pero por encima de los 30 °C adquiere la estructura fibrosa, se solidifica y libera lentamente el siARN a medida que se biodegrada el polímero. Estos complejos pueden usarse en forma de solución o bien como nanopartículas con un tamaño entre 100-300 nm siendo preferentemente aplicados en forma local sobre metástasis de próstata (80-82).

Los dendrosomas constituyen unos nuevos vehículos para la liberación de ácidos nucleicos constituidos por un dendrímero y una cubierta lipofílica lo que permite una notable reducción de la toxicidad que presentan los dendrímeros (83, 84).

4. NANOSISTEMAS LIPÍDICOS

Son moléculas anfifílicas constiuidas por una o dos cadenas de ácidos grasos (acil) o alquil, un grupo amino hidrofílico y un enlace entre la región polar y apolar. Algunos de los lípidos catiónicos mas utilizados en terapia génica son: DOSPA (2,3-dioleoiloxi-N-[2(spermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propaniminio trifluoroacetato); DOTAP ((N-[1-(2,3-dioleoiloxi)] N-N-N trimetilamonio propano), DDAB (Dimetildioctadecil amonio bromuro), DMRIE (N-(2 hidroxietil)-N,N-dimetil 2,3 bis (tetradeciloxi) 1 propamonio bromuro), TFX-50 [N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-di(oleoiloxi)-1,4-butanodiamonio ioduro] y Lipofectamina® un liposoma de formulación 3:1 (w/w) del lípido policationico 2,3-dioleiloxi-N-[2(spermincarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato y DOPE. Igualmente se han desarrollado derivados del colesterol como DC-COL (3b [N-(N'-dimetilaminoetil)-carbamoil] colesterol) (85) o bien derivados de cardiolipina, fosfotriésteres de fosfoglicéridos y esfingolípidos (86).

Con objeto de mejorar la capacidad de transfección es muy frecuente utilizar mezclas de lípidos catiónicos y asociarlos a colesterol, al lípido facilitador DOPE (1,2 dioleoilfosfatidiletanolamina) así como a derivados de la espermina: DOGS (dioctadecilamidoglicilespermina) para favorecer la condensación del siARN. Estos lípidos dan lugar a lipoplexes cargados negativamente con ADN y siARN los cuales presentan una elevada transfección in vitro pero in vivo poseen una baja capacidad de transfección de si ARN debido a su estabilidad intracelular. Por otra parte, el pequeño tamaño de estos ácidos nucleicos y las excesivas interacciones electrostáticas creadas con lípidos catiónicos determinan un elevado tamaño del complejo lipoplex y una baja estabilidad que favorece la degradación enzimática o física antes de que tenga lugar la liberación in vivo de si ARN en su célula diana.

La interacción que tiene lugar entre lípidos catiónicos y si ARN da lugar a la formación de lipoplexes de estructura multilamelar con un espesor de aproximadamente 3,7 nm cada bicapa (80) y unos 2 nm de siARN intercalado (87).

El paso de los siARN a través de las membranas celulares puede tener lugar por diversos mecanismos aun no bien identificados. Un estudio realizado con el lípido catiónico DharmaFECT (88) ha demostrado que el lipoplex con siARN penetra en el interior de la célula un 95% por un proceso de endocitosis del cual el 50% aproximadamente es mediada por la proteína clatrina y un 20% por endocitosis en fase fluida.

Xu y Szoka (89) han propuesto que la liberación de ácidos nucleicos con complejos lipídicos catiónicos se ve facilitada por su asociación con lípidos aniónicos de la membrana celular originándose una fusión que favorece la internalización de los ácidos nucleicos (Figura 16).

La liberación de siARN a nivel citosólico puede tener lugar por diversos procesos; uno de ellos es la desestabilización del nanosistema por el que conocemos como bomba de protones que hemos descrito anteriormente en el caso de algunos polímeros. Un fosfolípido pH dependiente es el citraconil-DOPE el cual en condiciones ácidas se degrada y desestabiliza el complejo lipídico-siARN (90). Otro proceso viene condicionado por la utilización de péptidos fusógenos como el

péptido dimérico diINF-7 que se ha revelado con capacidad de incrementar la liberación citosólica de macromoléculas incluidas en inmunoliposomas (91).

La eficacia de los liposomas catiónicos como sistemas de liberación de fármacos presenta diversos problemas debido a su toxicidad e inflamación pulmonar (92, 93) siendo estos efectos mas pronunciados con liposomas catiónicos multivalentes a base de Lipofectamina® que con liposomas catiónicos a base del lípido catiónico monovalente DOTAP.

La fusión es altamente dependiente del contenido en colesterol del lipoplex y de la membrana

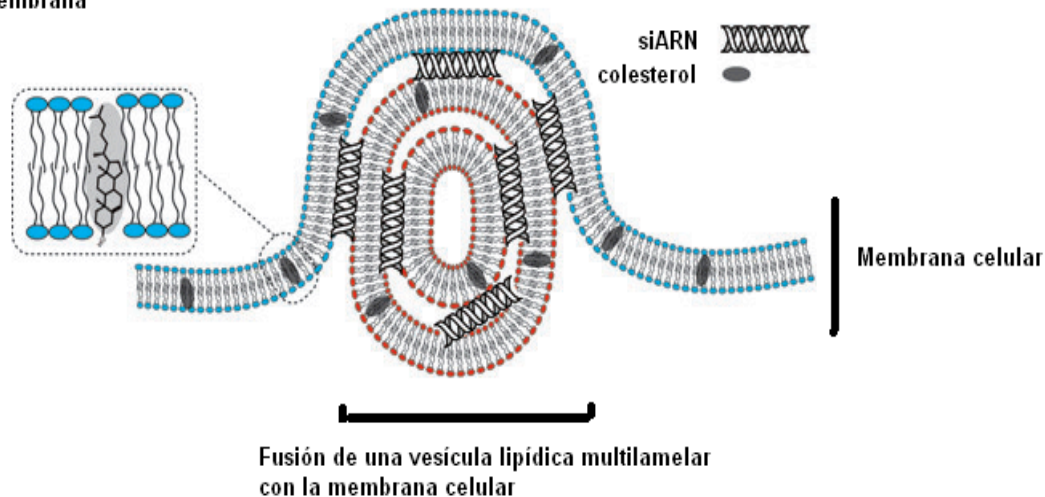


Figura 16. Representación esquemática de la fusión de lipoplexes multilamelares de siARN con la membrana celular.

Basándose en el elevado número de lípidos catiónicos sintetizados y su capacidad de liberación in vivo de ADN, Ren y *col.* (94) han establecido una serie de normas generales que incluyen: 1) 2 cadenas oleicas como restos hidrofóbicos, 2) la longitud de la cadena alquílica entre las dos cadenas oleicas no afecta a la capacidad de transfección y 3) la longitud de la cadena alquílica entre la cadena oleica y el grupo amino hace disminuir la capacidad de transfección.

Un aspecto importante en la composición de los sistemas lipídicos es la presencia de colesterol ya que juega un papel importante en la fusión a nivel de membrana, macropinocitosis y endocitosis por caveolina y fase fluida (88). En lugar de colesterol se han utilizado derivados como el colesteriloxipropano-1-amina (95) con el que se mejora la capacidad de transfección (96).

5. NANOLIPOSOMAS NEUTROS

Uno de los aspectos más relevantes de los nanosistemas para vehicular siARN es la utilización de liposomas neutros del tipo 1,2-dioleoil n-glicerofosfatidilcolina (DOPC) con un tamaño medio de 65 nm (97). Estos nanoliposomas pueden liberar in vivo a células tumorales de 10 a 30 veces mas siARN que liposomas catiónicos (DOTAP) (98). La administración de 150 µg /Kg.día de siARN 2 veces por semana permite reducir la expresión de genes EphA2, FAK, Neuropilin-2, IL-8 y Bcl-2 así como la reducción del tamaño de diferentes cánceres humanos

en ratones. Estos nanoliposomas no producen toxicidad sobre fibroblastos, médula ósea y células hematopoyéticas por lo que resultan muy atractivos para futuros desarrollos (99).

Además de las formulaciones de liposomas se han desarrollado sistemas lipídicos sólidos. Algunas de estas formulaciones estables, conteniendo ácidos nucleicos (SNALPs: solid nucleic acid lipid particles), están formadas por lípidos catiónicos y fusógenos y han permitido liberar siARN (2,5 mg/Kg) en monos produciéndose una marcada reducción de apolipoproteína B durante 11 días. Otras formulaciones son las llamadas nanopartículas lipídicas solidas: SLN (solid lipidic nanoparticles) constituidas por colesterol éster, triglicérido, colesterol, DOPE y DC colesterol.

6. LIPIDOIDES

Recientemente (100) se ha desarrollado, por Anylan Pharm y el MIT, una librería combinatoria de moléculas semejantes a los lípidos, conocidas por el nombre de lipidoides que se utilizan para formar novedosas formulaciones de nanopartículas para la liberación sistemática de productos terapéuticos de siARN y formados por mas de dos aminas, uniones amida entre las aminas y cadenas carbonadas, más de dos cadenas carbonadas, cadenas carbonadas entre 8 y 12 restos, al menos una amina secundaria. Los resultados de los estudios mostraron una liberación exitosa de formulaciones lipoides de pequeños ARNs de interferencia en varias especies de animales incluyendo ratones, ratas y que demuestran efectos potentes, específicos y duraderos en la expresión de genes en múltiples tejidos, como son el hígado, pulmón y macrófagos peritoneales. Las nanopartículas obtenidas, con un tamaño de 70-100 nm, están formadas por un lipidoide, colesterol y polietilenglicol-ceramida. Entre los diversos lipidoides desarrollados el compuesto más utilizado es el 98N12 (Figura 17).

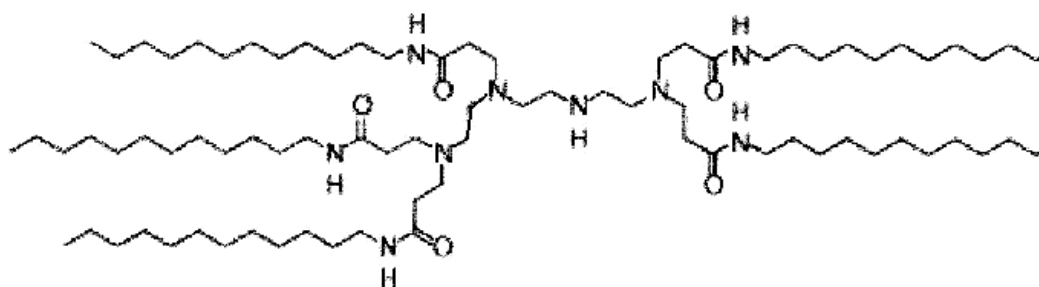


Figura 17. Estructura química del Lipidoide 98N12.

7. EPÍLOGO

Un número de importantes nanovehículos presentan actualmente una importante capacidad de liberación in vivo de siARN. Aunque durante algunos años han sido utilizados siARN en sistemas de uso local, como sistema pulmonar u ocular, sin embargo el empleo de nanoliposomas neutros y nanopartículas de quitosano o dendrosomas permiten utilizar siARN in vivo vía sistémica. Los

parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos y de seguridad están permitiendo desarrollar terapéuticas que pasen a fase clínica para cáncer y otras patologías.

8. REFERENCIAS

1. Fire, *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
2. A Dose Escalation Trial of an Intravitreal Injection of Sirna-027 in Patients With Subfoveal Choroidal Neovascularization (CNV) Secondary to Age-Related Macular Degeneration (AMD). ClinicalTrials.gov.
3. A Study Using Intravitreal Injections of a Small Interfering RNA in Patients With Age-Related Macular Degeneration. ClinicalTrials.gov.
4. Safety and Efficacy Study of Small Interfering RNA Molecule (Cand5) to Treat Diabetic Macular Edema. ClinicalTrials.gov.
5. Safety & Efficacy Study Evaluating the Combination of Bevasiranib & Lucentis Therapy in Wet AMD (CARBON) ClinicalTrials.gov.
6. Safety and efficacy study of small interfering ribonucleic acid (RNA) molecule (Cand5) to treat wet age-related macular degeneration. ClinicalTrials.gov.
7. Durcan, N., Murphy, C. & Cryan, A. (2008) Inhalable siRNA: potent as a therapeutic agent in the lungs. *Molecular Pharm.* 5(4): 559-566.
8. Phase II Clinical Trial of ALN-RSV01 demonstrates statistically significant anti-viral efficacy. Estudio GEMINI: www.alnylam.com.
9. Immunotherapy of melanoma with tumor antigen RNA and small inhibitory RNA transfected autologous dendritic cells. ClinicalTrials.gov.
10. Use of SV40 vectors to treat chronic myeloid leukemia (CML): ClinicalTrials.gov.
11. Safety Study of CALAA-01 to Treat Solid Tumor Cancers: ClinicalTrials.gov.
12. Davies, M. E. (2009) The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol. Pharm.* 6(3): 659-668.
13. Study with Atu027 in patients with advanced solid cancer. ClinicalTrials.gov.
14. The Role of Aromatic Hydrocarbon Receptor in the Tumorigenesis of Neuroblastoma and Its Relationship With MYCN Expression: ClinicalTrials.gov.
15. Single Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Operable Adenocarcinoma of the Pancreas Phase I - Multiple Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Adenocarcinoma of the Pancreas. ClinicalTrials.gov.
16. The Role of Glycosyltransferases in the Oncogenesis of Neuroblastoma. ClinicalTrials.gov.
17. Study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of liposomal siRNA in subjects with high cholesterol. ClinicalTrials.gov.
18. A dose escalation and safety study of I5NP to prevent AKI in patients undergoing major cardiovascular surgery (QRK.002): ClinicalTrials.gov.
19. I5NP for prophylaxis of delayed graft function in kidney transplantation: ClinicalTrials.gov.
20. Leachman, S. A., Hickerson, R. P., Schwartz, M. E., Bullough, E. E., Hutcherson, S. L., Boucher, K. M., Hansen, C. D., Eliason, M. J., Srivatsa, G. S., Kornbrust, D. J., Smith, F. J., McLean, W. I., Milstone, L. M. & Kaspar, R. L. (2010) First-in-human Mutation-targeted siRNA Phase Ib Trial of an Inherited Skin Disorder. *Mol. Ther.* 18(2): 442-446.
21. NUC B1000: <http://www.nucleonicsinc.com/clinical/index.html>
22. Chen, Y., Chen, G. & Mahato, R. (2008) RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res.* 25 (1): 72-86.
23. SYL040012. Tolerance and Effect on Intraocular Pressure in Subjects With Intraocular Pressure (IOP) \geq 21 mm Hg. ClinicalTrials.gov.
24. Ray, R. B. & Kanda, T. (2009) Inhibition of HCV replication by small interfering RNA. *Methods Mol. Bio.* 510: 251-62.
25. Kim, S. I., Shin, D., Lee, H., Ahn, B. Y., Yoon, Y. & Kim, M. (2009) Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J. Hepatol.* 50(3): 479-88.
26. Caldwell, D. J. & Evans J. D. (2008) Developing clinical role of a CCR5 coreceptor antagonist in HIV-1 infection. *Expert Opin. Pharmacother.* 9 (18): 3231-3242.
27. Subramanya, S., Kim, S. S., Manjunath, N. & Shankar, P. (2010) RNA-interference based therapeutics for human immunodeficiency HIV-1 treatment; synthetic siRNA or vector - based shRNA. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10(2): 201-213.

28. Zhou, J., Swiderski, P., Li, H., Zhang, J., Neff, C. P., Akkina, R. & Rossi, J. J. (2009) Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res.* 37(9): 3094-3109.
29. Ross, C. A. & Shoulson, I. (2009) Huntington disease: Pathogenesis, biomarkers and approaches to experimental therapeutics. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3: S135-138.
30. Tanahashi, H. & Yoshioka, K. (2008) RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein. *Neurosci. Lett.* 439(3): 293-297.
31. Gilmore, I. R., Fox, S. P., Hollins, A. J., Sohail, M. & Akhtar, S. (2004) The design exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J. Drug Target.* 3: 147-155.
32. Judge, A. D. *et al.* (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23(4): 457-462.
33. Kim, D. H. *et al.* (2004) Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by fago polymerase. *Nat. Biotechnol.* 22(3): 321-325.
34. Hornung, V. *et al.* (2005) Sequence-specific potent induction of IFN alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11(3): 263-270.
35. Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V. & Sah, D. W. (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* 2: 711-719.
36. Jackson, A. L. *et al.* (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduce off-target transcript silencing. *RNA.* 12: 1197-1205.
37. Reynolds, A. *et al.* (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22: 326-330.
38. Akhtar, S. & Benter, I. F. (2007) Nonviral delivery of synthetic siRNA in vivo. *J. Clin. Invest.* 117(12): 3623-3631.
39. Lin, X. *et al.* (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* 33: 4527-4535.
40. Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. & Prydz, H. (2003) Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31: 589-595.
41. Morrissey, D. V. *et al.* (2005) Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology.* 41: 1349-1356.
42. Li, W. & Szoka, F. C. Jr. (2007) Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res.* 24: 438-449.
43. Soutschek, J. *et al.* (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 432: 173-178.
44. Birmingham, A. *et al.* (2005) 3'UTR seeds matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods.* 3: 199-204.
45. Ishihara, T., Goto, M., Kodera, K., Kanazawa, H., Murakami, Y., Mizushima, Y. & Higaki, M. (2009) Intracellular delivery of siRNA by cell-penetrating peptides modified with cationic oligopeptides. *Drug Deliv.* 16(3): 153-159.
46. Soutschek, K. *et al.* (2004) Therapeutics silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNA. *Nature.* 432: 173-178.
47. Kim, S. H., Jeong, H. J., Lee, S. H., Kim, S. W. & Park, T. G. (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J. Control. Rel.* 129: 107-116.
48. Chu, T. C., Twu, K. Y., Ellington, A. D. & Levy, M. (2006) Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res.* 34: e73.
49. Dassie, J. P., Liu, X. Y., Thomas, G. S., Whitaker, R. M., Thiel, K. W., Stockdale, K. R., Meyerholz, D. K., McCaffrey, A. P., McNamara, J. O. 2nd & Giangrande, P. H. (2009) Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol.* 27(9): 839-849.
50. Schaffert, D. *et al.* (2008) Gene therapy progress and prospects: Synthetic polymer-based systems. *Gene Ther.* 15: 1131-1138.
51. Fougères, A. R. (2008) Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Human Gene Ther.* 19: 125-132.
52. Grayson, A. C., Doody, A. M. & Putnam, D. (2006) Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm. Res.* 23: 1868-2876.
53. Merkel, O. M., Librizzi, D., Pfestroff, A., Schurrat, T., Buyens, K., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., Béhé, M. & Kissel, T. (2009) Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and

- Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J. Control Release.* 138(2): 148-159.
54. Merkel, O. M., Beyerle, A., Librizzi, D., Pfestroff, A., Behr, T. M., Sproat, B., Barth, P. J. & Kissel, T. (2009) Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol. Pharm.* 6(4): 1246-1260.
 55. Alshamsan, A., Haddadi, A., Incani, V., Samuel, J., Lavasanifar, A. & Uludağ, H. (2009) Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine. *Mol. Pharm.* 6(1): 121-133.
 56. Creusat, G. & Zuber, G. (2008) Tyrosine-modified PEI: a novel and highly efficient vector for siRNA delivery in mammalian cells. *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf).* 52: 91-92.
 57. Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A. & Wagner, E. (2008) Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug Chem.* (7): 1448-1455.
 58. Hoon Jeong, J., Christensen, L. V., Yockman, J. W., Zhong, Z., Engbersen, J. F., Jong Kim, W., Feijen, J. & Wan Kim, S. (2007) Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference. *Biomaterials.* 28(10): 1912-1917.
 59. Kim, S. H., Jeong, J. H., Lee, S. H., Kim, S. W. & Park, T. G. (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J. Controlled Rel.* 129: 107-116.
 60. Heidel, J. D., Yu, Z., Liu, J. Y., Rele, S. M., Liang, Y., Zeidan, R. K., Kornbrust, D. J. & Davis, M. E. (2007) Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(14): 5715-5721.
 61. Davis, M. E. (2009) Design and development of IT-101, a cyclodextrin-containing polymer conjugate of camptothecin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(13): 1189-1192.
 62. Ji, A. M., Su, D., Che, O., Li, W. S., Sun, L., Zhang, Z. Y., Yang, B. & Xu, F. (2009) Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology.* 20(40): 405103.
 63. Andersen, M. Ø., Howard, K. A. & Kjems, J. (2009) RNAi using a chitosan/siRNA nanoparticle system: in vitro and in vivo applications. *Methods Mol. Biol.* 555: 77-86.
 64. Gao, S., Dagnaes-Hansen, F., Nielsen, E. J., Wengel, J., Besenbacher, F., Howard, K. A. & Kjems, J. (2009) The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol. Ther.* 17(7): 1225-1233.
 65. Mao, S., Sun, W. & Kissel, T. (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Del. Rev.* 62: 12-27.
 66. Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. O., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., Hansen, O. C., Besenbacher, F. & Kjems, J. (2007) The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials.* 28: 1280-1288.
 67. Katas, H. & Alpar, H. O. (2006) Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J. Control. Release.* 115: 216-225.
 68. Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. Ø., Hovgaard, M. B., Schmitz, A., Nyengaard, J. R., Besenbacher, F. & Kjems, J. (2006) RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol. Ther.* 14: 476-484.
 69. Raviña, M. (2009) Diseño de nanosistemas poliméricos para la vehiculización de material genético. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
 70. Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Y., Pan, Y., Zhao, J., Ren, L., Liao, M., Hu, Z., Kong, L. & Wang, J. (2007) A novel PEGylation of chitosan nanoparticles for gene delivery. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46: 197-204.
 71. Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2008) Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure-activity relationships in vitro. *J. Control Release.* 125: 145-154.
 72. Gao, J. Q., Zhao, Q. Q., Lv, T. F., Shuai, W. P., Zhou, J., Tang, G. P., Liang, W. Q., Tabata, Y. & Hu, Y. L. (2010) Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. *Int. J. Pharm.* 387(1-2): 286-294.
 73. Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techaarpornkul, S., Ngawhirunpat, T. & Ruktanonchai, U. (2008) Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharm. Res.* 25: 2807-2814.

74. Ghosn, B., Singh, A. & Roy, K. (2008) Efficient siRNA delivery by secondary and tertiary amine modified polysaccharides. *NSTI-Nanotech.* 2: 338-341.
75. Lee, D. W., Yun, K.-S., Ban, H.-S., Choe, W., Lee, S. K. & Lee, K. Y. (2009) Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *J. Control Release.* 139: 146-152.
76. Jere, D., Jiang, H.-L., Kim, Y.-K., Arote, R., Choi, Y.-J., Yun, C.-H., Cho, M.-H. & Cho, C.-S.: (2009) Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. *Int. J. Pharm.* 378: 194-200.
77. Jiang, H.-L., Xu, C.-X., Kim, Y.-K., Arote, R., Jere, D., Lim, H.-T., Cho, M.-H. & Cho, C.-S. (2009) The suppression of lung tumorigenesis by aerosol-delivered folate-chitosan-graft-polyethylenimine/Akt1 siRNA complexes through the Akt signaling pathway. *Biomaterials.* 30: 5844-5852.
78. Rudzinski, W. E. & Aminabhavi, T. M. (2010) Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *International J. Phar.* 399: 1-11.
79. Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T. I., Terada, T. M. & Ochiyal, O. (2004) Atelocollagen-mediated synthetic small interferingRNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research.* 132: 13 e109.
80. Mu, P., Nagahara, S., Makita, M., Tarumi, Y., Kadomatsu, K. & Takei, Y. (2010) Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 25(12): 2978-90.
81. Forootan, S. S., Bao, Z. Z., Forootan, F. S., Kamalian, L., Zhang, Y., Bee, A., Foster, C. S. & Ke, Y. (2010) Atelocollagen-delivered siRNA targeting the FABP5 gene as an experimental therapy for prostate cancer in mouse xenografts. *Int. J. Oncol.* 36(1): 69-76.
82. Dutta, T., Narendra, N. K., Nigel, A. J. McMillan, A. J. & Parekh, H. S. (2010) Nanomedicine. *Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 6: 460-470.
83. Dutta, T., Agashe, H. B., Vijayarajkumar, P., Joshi, M. & Jain, N. K. (2006) Dendrosome based gene delivery. *J. Exp. Nanoscience.* 1: 235-248.
84. Gao, H. & Hui, K. M. (2001) Novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives. *Gene Ther.* 8: 855-863.
85. de Fougères, A. R. (2008) Delivery vehicles for small interfering siRNA in vivo. *Human Gen. Ther.* 19: 125-132.
86. Weisman, S., Hirsch-Lerner, D., Barenholz Y. & Talmon, Y. (2004) Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys. J.* 87: 609-614.
87. Radler, J. O., Koltover, I., Saldin, T. & Safinya, C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposomes complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science.* 275: 810-814.
88. Lu, J. J., Langer, R. & Chen J. (2009) A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol. Pharm.* 6: 763-771.
89. Xu, Y. & Szoka, F. C. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes issued in cell transfection. *Biochemistry.* 35: 5616-5623.
90. Reddy, J. A. & Low, P. S. (2000) Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation. *J. Control Release.* 64: 27-37.
91. Fretz, M. M., Mastrobattista, E., Koning, G. A., Jiskoot, W. & Storm, G. (2005) Strategies for cytosolic delivery of liposomal macromolecules. *Int. J. Pharm.* 298: 305-309.
92. Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V. & Rojanasakul, Y. (2000) Oxygen radical-mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm. Res.* 17: 521.
93. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control Release.* 114: 100-109.
94. Ren, T., Song, Y. K., Zhang, G. & Liu, D. (2000) Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse. *Gene Ther.* 7: 764-768.
95. Han, S. E., Kang, H. & Shim, G. Y. (2008) Novel cationic cholesterol derivative-based liposomes for serum-enhanced delivery of siRNA. *Int. J. Pharm.* 353: 260-269.
96. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N. *et al.* (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 25: 1149-1157.
97. Ozpolat, B., Sood, A.K. & Lopez-Berensteinm G. (2009) Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. Int Med.* 267: 44-53.
98. Gewirtz, A. M. (2007) On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J. Clin. Invest.* 117: 3612-3614.

99. Pecot, C. V., Calin, G. A., Coleman, R. L., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. (2011) RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer*. 11: 59-67.
 100. Nguyen, D. N., Chen, S. CH., Lu, J., Goldberg, M., Kim, P., Sprague, A., Novobrantseva, T., Sherman, J., Shulga-Morskaya, S., Antonin de Fougères, A., Chen, J., Langer, R. & Anderson, D. G. (2009) Drug Delivery-mediated Control of RNA Immunostimulation. *Molecular Therapy*. 17: 1555-1562.
-

El papel del fitoplancton en el cambio climático: ¿cuánto depende nuestro destino de unas pequeñas microalgas?

Eduardo Costas*, Victoria López Rodas.

Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 17 de febrero de 2011.

e-mail: Ecostas@vet.ucm.es

RESUMEN

Hoy en día estamos viviendo un período de cambio global rápido en el cual alrededor de 30.000 especies llegan a extinguirse anualmente debido a las actividades humanas que están alterando los procesos biogeoquímicos a nivel de la biosfera. Los ciclos de la biosfera tal vez lleguen a ser menos predictibles si los microorganismos esenciales sucumben al cambio climático y a las actividades antropogénicas. En particular, las microalgas y cianobacterias juegan un importante rol en el control del cambio global pues son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos, produciendo alrededor del 50% de la fotosíntesis total. El equilibrio entre respiración-oxidación ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \Rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$) y fotosíntesis ($6 CO_2 + 6 H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2$) marca la pauta del CO_2 y consecuentemente del cambio climático. Investigar la capacidad diferencial de respuesta del fitoplancton al forzamiento ambiental inducido por los humanos ha llegado a ser clave para entender las futuras repercusiones sobre el funcionamiento de los ecosistemas a nivel planetario. Nuestros estudios muestran que los diferentes grupos funcionales del fitoplancton (p.e. fitoplancton oceánico, costero, simbiote de corales, continental...) tienen muy diferente capacidad de adaptarse al cambio global. La capacidad de las diferentes microalgas puede explicarse en relación a la estructura genética de la población, tasa de crecimiento, tasa de mutación, ploidía, preferencia de hábitat y grupo taxonómico. Las poblaciones de microalgas oceánicas son las que muestran la mínima capacidad de adaptación al cambio. Como el océano es el mayor ecosistema de la Tierra, las perspectivas futuras no son buenas.

Palabras clave: Cambio global; CO_2 ; fitoplancton; fotosíntesis.

ABSTRACT

The role of phytoplankton in climate change: depends our future of some small microalgae?

Nowadays, we are living in a rapid global change period in which around 30,000 species go extinct annually due to those human activities that are altering biosphere-level biogeochemistry processes. Biosphere level cycles may become less predictable as essential microbes succumb to climatic change and anthropogenic activities. In particular, since microalgae and cyanobacteria play an important role in control of global change because they are the principal primary producers of aquatic ecosystems producing around 50% total photosynthesis. Balance between respiration -oxidation ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \Rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$) and photosynthesis ($6 CO_2 + 6 H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2$) is the pacemaker of CO_2 and consequently of climatic change. Investigating the differential capacity of the response of phytoplankton to human-induced environmental forcing has become a key issue to understanding further the future repercussions on the functioning of ecosystems at planetary level. Our studies show that different functional phytoplanktonic groups (ie. oceanic, coastal, coral-symbionts, continental phytoplankton...) have very different capability for adaptation to global change. The capacity of different microalgal species to adapt to global change can be explained in relation to population genetics structure, growth rate, mutation rate, ploidy, habitat preference and taxonomic group. Populations of oceanic microalgae showed the minimal capacity to adapt to change. Since open ocean is the biggest ecosystem on the Earth, future perspectives are not good.

Key words: Climatic change; CO_2 ; phytoplankton; photosynthesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tiempos de cambio global

Hoy en día los humanos somos los organismos con mayor impacto ecológico sobre nuestro planeta y tal vez la principal fuerza que condiciona su evolución (1). Somos muchos, crecemos exponencialmente, ocupamos casi todos los hábitats destruyendo buena parte de ellos, manejamos una cantidad ingente de energía y disponemos de una poderosa tecnología en rápida expansión que condiciona el destino de la Tierra. La principal característica del período que nos toca vivir es el ritmo cada vez más acelerado al que ocurren los cambios. Nuestras cosechas, ganadería, pesca, caza, ciencia, tecnología, medicina, comunicaciones, contaminación... están cambiando a velocidades de vértigo el funcionamiento de la Tierra a escala planetaria: vivimos tiempos de cambios tan grandes y rápidos como probablemente nunca se vieron en la historia de la Tierra: son los tiempos del Cambio Global.

Ya en una fecha tan temprana como 1896, Svante Arrhenius advirtió que la liberación de CO₂ a la atmósfera, como resultado de las actividades humanas, podría llevar a la Tierra a un calentamiento global de consecuencias catastróficas para la civilización. Sin embargo, solamente a partir del trabajo pionero iniciado por Dave Keeling en Mauna Loa (Hawai) en 1958 registrando mensualmente los niveles de CO₂ atmosférico, ha podido constatarse, sin ningún género de dudas, que los niveles de dióxido de carbono (el principal gas de efecto invernadero junto con el vapor de agua) en la atmósfera han ido aumentando progresivamente durante los últimos 50 años como consecuencia de las actividades humanas. Desde entonces varios miles de trabajos de investigación han perfilado nuestras ideas sobre este interesante período en el que estamos inmersos y del que somos la causa: el Antropoceno (2).

El nuevo milenio comenzó en medio de una preocupación creciente sobre el tema. Como ejemplo de ello, la National Academic of Science USA (la institución científica más importante del mundo) organizó en 2001 el "Colloquium on the Future of the Evolution" un macro-simposium en el que se concluyó que el cambio global de origen antropogénico es el mayor peligro al que se enfrenta actualmente la biosfera (y nosotros mismos como especie) y terminó con la recomendación de realizar urgentemente más investigaciones orientadas a conocer los efectos del cambio global sobre la pérdida de la biodiversidad y a averiguar como detener estos efectos adversos del cambio global en medida de lo posible. Complementariamente, los PNAS publicaron una serie de interesantes revisiones sobre el tema (p.e. ver referencias (3-5)).

En la actualidad esta preocupación ha trascendido del mero ambiente académico, generando a menudo noticias de primera plana en los medios de comunicación y resultando un tema recurrente en el debate político. Quizás el mejor indicio de la relevancia social que se le ha dado al cambio global de origen antropogénico venga dado porque entre los "best-sellers" de más éxito, podemos encontrar numerosos libros técnicos sobre el tema -algunos con un fuerte contenido social como los de Gore (6) o Lovelock (7), pero otros con un gran contenido conceptual en "Ciencias de la Tierra" como los de Flannery (8) o Weisman (9)-. Documentales y ciclos de conferencias como "Una verdad incómoda" de Al Gore, o el reconocimiento con el Premio Nobel al Panel

Internacional de Cambio Climático o con el Príncipe de Asturias al propio Al Gore vienen a incidir sobre la enorme trascendencia que el Cambio Global tiene en la actualidad.

1.2. La importancia de una foto: Biosferas como máquinas térmicas con flujo abierto de energía y ciclo cerrado de materia

Una simple fotografía tomada por el astronauta Bill Anders en 1968 durante la misión APOLO 8 cambió para siempre nuestra percepción del mundo. En ella se ve a la Tierra, nuestro único y común hogar, flotando en el espacio como un pequeño globo azul pálido. La foto refleja la fragilidad y pequeñez de un mundo que prácticamente considerábamos inacabable y pone de manifiesto que se trata de un sistema limitado, abierto en cuanto a la energía y prácticamente cerrado para la materia. En efecto, termodinámicamente hablando, la biosfera que conocemos en la Tierra no es más que el resultado del funcionamiento de una máquina térmica abierta para la energía y cerrada para la materia, que utiliza el Sol como fuente caliente y el espacio exterior como sumidero frío. Como ni la fuente caliente (el Sol) ni el sumidero frío (el espacio exterior que está a pocos grados sobre el cero absoluto) cambian con rapidez, el balance térmico de la Tierra dependerá del equilibrio entre cuánta radiación absorba nuestro planeta y cuánta emita. En este balance la composición de superficie de la Tierra es fundamental. Pero en la Tierra su capa más externa es la atmósfera. Una densa atmósfera rica en gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, vapor de agua, metano...) dará lugar a un planeta con una superficie ardiente tipo Venus; una tenue atmósfera con pocos gases invernadero originará un gélido desierto tipo Marte.

A partir de la fotografía de Anders, los científicos comenzaron a trabajar en pequeñas biosferas experimentales cerradas en cuanto a materia y abiertas en cuanto a energía (Sagan 10). Estas biosferas no son más que recipientes de cristal herméticamente cerrados, más o menos esféricos, rellenos en parte de agua con nutrientes y la otra parte de una atmósfera confinada. Encierran un ecosistema sencillo con productores primarios (microalgas flotando en el agua), productores secundarios (gambas comedoras de dichas algas) y descomponedores (hongos y bacterias que remineralizan los restos orgánicos). Si estas biosferas se mantienen expuestas a un flujo de energía adecuado (la cantidad necesaria de luz), sus organismos se mantienen vivos durante años reciclando la materia (lo que empezó como una serie de experimentos orientados a diseñar misiones espaciales de muy larga duración, terminó siendo un negocio rentable para la NASA que en la actualidad vende biosferas al gran público).

Tal vez la característica más destacada de dichas biosferas es que su atmósfera se encuentra muy lejos del equilibrio: en efecto, en la atmósfera de las biosferas, al igual que en la atmósfera de la Tierra, podemos encontrar grandes cantidades de oxígeno libre. Aunque estamos acostumbrados (y gracias a ello respiramos), la existencia de oxígeno libre no deja de ser un fenómeno muy extraño: existen grandes cantidades de sustancias que se oxidan fácilmente (en especial mucha materia orgánica libre). Si hay tanto oxígeno libre ¿cómo es que no todo este oxígeno acaba oxidando a esta materia orgánica?

1.3. Una reacción para el equilibrio:

La sencilla reacción: $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightleftharpoons 6 CO_2 + 6 H_2O$ [1] uno de los grandes tótems canónicos de nuestra Ciencia, nos da la explicación al anterior

enigma. De inmediato reconocemos en ella la reacción parcial que representa la respiración: $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \Rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$ [2] gracias a la cual obtenemos la energía necesaria para mantenernos vivos. Si solo funcionase esta oxidación, se agotaría el oxígeno libre de la atmósfera (incluso relativamente rápido) pues hay en la Tierra suficiente materia orgánica como para ello. Durante una buena parte de la historia de la vida en la Tierra no hubo una atmósfera oxidante con oxígeno libre. La otra reacción parcial aporta la clave: $6 CO_2 + 6 H_2O \Rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6 O_2$ [3] se trata de la ecuación que representa la fotosíntesis. Desde que proliferaron las cianobacterias y las microalgas el equilibrio se desplazó en este sentido y apareció una atmósfera muy rica en oxígeno libre y escasa en dióxido de carbono que ha permitido la existencia de animales de gran tamaño como nosotros.

No hace falta ir a Marte para saber que no hay en su superficie una rica vida fotosintética como la que hay en la Tierra. Si la hubiese, su atmósfera, lejos del equilibrio, contendría cantidades significativas de oxígeno libre (11).

Sin duda, en el equilibrio de la reacción respiración-fotosíntesis [1], los organismos fotosintetizadores juegan un papel protagonista. Una parte de los fotosintetizadores son plantas terrestres, pero el mar ocupa el 70% de la superficie del planeta y recibe la gran mayoría de la radiación solar. Por tanto buena parte de la clave del equilibrio estará en los organismos fotosintetizadores marinos, en su gran mayoría organismos fitoplanctónicos microscópicos, verdaderos protagonistas del balance del dióxido de carbono en la Tierra y por tanto del destino del cambio climático.

2. EL RELEVANTE PAPEL DEL FITOPLANCTON EN EL DESTINO DEL CAMBIO CLIMÁTICO

2.1. Cambiando tradiciones milenarias en la Biosfera

Los hombres, unos recién llegados al planeta (si la historia de la vida en la Tierra solo durase un año, nosotros apenas apareceríamos a punto para comernos la última uva en la noche fin de año), con la rebeldía irreflexiva que caracteriza a los adolescentes, estamos cambiando una de las más antiguas tradiciones de la Biosfera: en efecto, el Sol, la fuente caliente de nuestra máquina térmica, es una pequeña estrella en proceso de convertirse en una gigante roja; a lo largo de este proceso, el Sol prácticamente duplicó la radiación incidente que envía a la Tierra desde que hace cerca de 4.000 millones de años apareció la vida sobre ella inaugurando la Biosfera. Pese a este gran incremento de la radiación solar, la Tierra siempre fue habitable y la temperatura varió muy poco a lo largo de eones durante las distintas eras geológicas.

La vida encontró la solución: secuestrar gases de efecto invernadero de la atmósfera, manteniendo así una temperatura adecuada en la Biosfera. Mediante la fotosíntesis los productores primarios secuestraron CO_2 de la atmósfera, acumulándolo en forma de materia orgánica reducida de las que los combustibles fósiles (petróleo y carbón) son buenos ejemplos. La biosfera acumuló también gases de invernadero de otras muchas formas “ingeniosas”, por ejemplo secuestrando grandes cantidades de CO_2 atmosférico en forma de carbonato cálcico con el que construir los hermosos caparazones de multitud de organismos (los magníficos cocolitos de las actuales haptofíceas son un extraordinario

ejemplo), o secuestrando metano en forma de clatratos de metano en los fondos marinos (cuya cantidad parece exceder a las reservas totales de combustibles fósiles).

La llegada de los hombres con su revolución industrial y tecnológica basada en la quema de combustibles fósiles, está invirtiendo una tradición que tiene eones de buen funcionamiento. Por el momento ya hemos liberado a la atmósfera algo más de 450.000 megatoneladas de CO₂ y el ritmo sigue incrementándose muy rápidamente a medida que nuevos países emergentes (p.e. China) van alcanzando elevados niveles de desarrollo.

Además de la quema de combustibles fósiles estamos alterando la atmósfera del planeta mediante diversas formas. Una de ellas consiste en utilizar masivamente la reacción de Haber para convertir el gas atmosférico más abundante (el nitrógeno, que en su forma molecular N₂ permanece prácticamente inerte durante eones) en nitratos liberados como fertilizantes agrícolas en la biosfera produciendo la indeseada eutrofización de las aguas continentales. Por el momento ya hemos retirado de la atmósfera unas 155 megatoneladas de nitrógeno. Pero seguimos influyendo sobre la composición atmosférica mediante numerosos procesos (p.e. CFCs y la destrucción de la capa de Ozono, emisiones sulfurosas originando la lluvia ácida, etc.) (8).

2.2. ¿Por qué algunos seres vivos podemos alterar tan rápidamente a la composición de la atmósfera?

Durante la época de los grandes viajes de descubrimiento, los seres humanos eran muy aficionados a representar el mundo que iban desvelando en sus expediciones geográficas en forma de hermosos globos terráqueos de madera bellamente decorada. Basta echarles un rápido vistazo para darse cuenta de los grandísimos errores cartográficos de estas admirables obras. Sin embargo acertaron de pleno en una de sus representaciones: estos globos terráqueos estaban recubiertos de una fina capa de cera para protegerlos; la proporción que guarda esta delicada capa de cera con respecto al tamaño total del globo terráqueo que recubre, es similar en proporción al espesor de la atmósfera con respecto a la Tierra. A pesar de lo que pensamos, la atmósfera terrestre es apenas una tenue y delgada capa recubriendo el planeta. Pero toda la biosfera terrestre depende de tan endeble recubrimiento. Al ser tan pequeña, los seres vivos podemos realizar grandes cambios en la composición atmosférica en muy poco tiempo.

2.3. Ligados por el destino: El mar y el CO2

Aunque nuestro planeta se llame la Tierra, es el mar quien ocupa la gran mayoría de su superficie. Consecuentemente recibe casi las $\frac{3}{4}$ partes de la radiación solar incidente que llega al planeta. Aunque solo fuese por su enorme superficie, el intercambio de gases entre el mar y la atmósfera determinará en buena medida el destino del CO₂ procedente de las actividades humanas. De hecho los océanos son el principal reservorio de CO₂ del planeta. Aproximadamente la mitad de las 450.000 millones de toneladas de CO₂ producido por el hombre ya se encuentra retenido en los océanos (12). A comienzos de la era industrial la atmósfera terrestre contenía 280 ppm de CO₂. En la actualidad contiene 381.5 ppm, pero de no haber sido por la capacidad de secuestrar CO₂ del mar, en la actualidad habría 55 ppm más de CO₂ atmosférico de las que hay hoy en día, con consecuencias catastróficas -según los últimos datos (IPCC 2007) la temperatura

media en Europa aumentó como media 0.95 °C durante el siglo XX, en especial a partir de los años 70-. Así el destino del planeta va íntimamente ligado a la capacidad del mar para retener el CO₂.

El secuestro de CO₂ en el medio marino tiene una componente regional muy acusada: así el Atlántico Norte que solo ocupa el 15% del área oceánica total secuestró el 23% del total de CO₂ procedente de emisiones antropogénicas (12, 13). En particular, algunos lugares como el Golfo de Cádiz, durante determinadas épocas presentan una capacidad de secuestrar CO₂ extraordinariamente elevada, en función de la actividad biológica de la comunidad fitoplanctónica y de su tránsito efectivo hacia otros niveles tróficos (14, 15).

La captación de CO₂ por el medio marino se ve muy influida por los factores meteorológicos que condicionan el forzamiento atmosférico local. Dicha captación se ve condicionada por una serie de mecanismos diferentes: El primero de ellos es un mecanismo físico, la bomba de solubilidad, controlado por la temperatura (y lógicamente mas efectivo en las altas latitudes con bajas temperaturas donde la solubilidad de gases en agua es mayor). El segundo es un mecanismo químico, la bomba química, basado en la interacción de distintas formas de carbono inorgánico (p.e. iones carbonato, bicarbonato...). Dado que estos dos mecanismos se encuentran acoplados a menudo se les conoce genéricamente como “bomba física”. El tercer mecanismo, la bomba biológica, depende de la fijación fotosintética de carbono por parte del fitoplancton mediante la fotosíntesis. De este modo se consigue fijar carbono inorgánico en forma de materia orgánica, buena parte de la cual es transportada a zonas oceánicas profundas mediante sedimentación. En los últimos tiempos se está dando la máxima importancia a la captura de CO₂ en la plataforma continental o “bomba continental”. A menudo la bomba continental consigue verdaderos récords en fijación de CO₂ al combinar el agua fría que se encuentra en las márgenes continentales, con muy elevadas producciones primarias. En este sentido hay que recordar que las plataformas continentales son responsables de hasta el 30% de la producción primaria de los océanos.

2.4. El cambio peligroso: Captación de CO₂ y calentamiento global

Aunque apenas hemos comenzado a entender sus mecanismos, tenemos la evidencia de que los procesos de captación de CO₂ van a verse muy influenciados por el cambio global, si bien todavía estamos lejos de conocer hasta que punto lo harán. Entre los efectos incuestionables del cambio global está el incremento de la temperatura oceánica, con lo que la bomba de solubilidad podría llegar a ser cada vez mas ineficiente. Por otra parte, a medida que cada vez mas CO₂ vaya disolviéndose en el mar, el pH oceánico bajará (y hay evidencias de que ya ha ocurrido), lo cual afectará significativamente al funcionamiento de la bomba química. Pero sin duda el cambio global tendrá un enorme efecto sobre el fitoplancton. Del modo en que los organismos fitoplanctónicos, clave del funcionamiento de la bomba biológica y principales protagonistas de la captación de CO₂, sean capaces de responder al cambio global dependerá en buena medida el destino de nuestro planeta en un futuro próximo.

2.5. La vastedad desolada: las claves para entender un sorprendente reparto en la producción primaria (y la mayor extinción en masa)

El océano abierto (alta mar) es la mayor extensión de nuestro planeta (con casi el 65% de su superficie) y por tanto, recibe la mayor parte de la radiación solar incidente que nos llega desde el Sol. Pero contrariamente a lo que cabría esperar no contribuye con el 65% de la producción primaria (ni muchísimo menos). Ni tan siquiera llega a un 30% de la producción primaria total. En realidad el océano abierto es en su mayor parte una vastedad desolada. En alta mar podemos encontrarnos los mayores desiertos del Planeta (con producciones primarias a menudo inferiores a la producción primaria media del desierto del Sahara) (16, 17).

Resulta fácil entender: el océano abierto es una estructura tridimensional, donde los nutrientes tienden a acumularse en el fondo a unos pocos kilómetros de profundidad. Los cadáveres de microorganismos, zooplancton, peces y demás componentes de la cadena trófica terminan por llegar al fondo marino más tarde o más temprano empujados por la gravedad. Una vez allí les resulta muy difícil ascender contra las fuerzas gravitatorias y tan solo logran alcanzar de nuevo la superficie en determinadas ocasiones en las ciertas áreas de afloramiento en las que el agua profunda asciende empujada por una serie de procesos oceanográficos (16). Estas zonas corresponden a las áreas marinas más productivas, a menudo asociadas con grandes pesquerías. Por el contrario la luz se extingue progresivamente en las primeras decenas de metros, justo donde los nutrientes escasean. Así los organismos fitoplanctónicos tienen luz en la superficie, pero muy pocos nutrientes. Por el contrario, en el fondo tendrían nutrientes pero no luz. El resultado general es un sistema que presente fuertes tendencias hacia una escasa producción primaria.

No todas las reservas de agua líquida del planeta corresponden a zonas de aguas profundas. Existe una importante zona costera con aguas poco profundas, (correspondiente a la plataforma continental) con fuerte circulación de nutrientes y en general una elevada producción primaria. En ella, debido a su poca profundidad (menos de 200 m) hay luz y nutrientes en abundancia permitiendo a menudo una gran abundancia de fitoplancton con elevadas producciones primarias.

Aunque la plataforma continental, hogar del fitoplancton costero y de la mayoría de los organismos marinos que nos son familiares, apenas ocupa en la actualidad el 12% de la superficie marina, su contribución a la producción primaria del planeta es fundamental. Para entenderlo basta un indicio: en el Pérmico todos los continentes de la Tierra se juntaron en un solo mega-continente. Por una simple cuestión geométrica de relación perímetro-superficie, el área total de la plataforma continental alcanzó su valor mínimo (los muchos continentes e islas separados de la actualidad tienen mucha más superficie costera que uno solo agrupado y cuasi-circular). La fusión de todas las tierras emergidas en el supercontinente Pangea, coincidió con la Gran Extinción del Pérmico, la mayor extinción en masa de la historia de nuestro planeta, que costó la vida probablemente a más del 90% de las especies sobre el planeta.

2.6. Las distintas “estrategias” del fitoplancton: grupos funcionales con un papel diferente.

A la hora de intentar hacer predicciones sobre el comportamiento del fitoplancton frente al cambio global (y en especial sobre sus complejas interacciones), hay que tener en cuenta que los organismos fitoplanctónicos son muy diversos, condicionados por las características del hábitat que ocupan. Aún a riesgo de caer en una simplificación excesiva, agruparemos, a *grosso modo* el fitoplancton en 4 grupos funcionales claramente diferenciados (Figura 1) cuyas principales características se resumen a continuación:

1. FITOPLANCTON OCEÁNICO: Su extraordinaria relevancia en la Tierra resulta obvia puesto que colonizan con mucho la mayor superficie del planeta ($\approx 65\%$). El fitoplancton oceánico está compuesto en su mayoría por organismos de pequeño tamaño (como flagelados eucariotas tipo haptofitas y pequeños procariontes como proclorofitas y cianobacterias). Son organismos condicionados por la baja densidad de nutrientes de su entorno, por lo que viven a bajas concentraciones, obligados a mantenerse cerca de la superficie. Pese a su baja productividad, pueden ser responsables de casi el 30% de la producción primaria total de la Tierra, al ocupar una extensión tan extensa. Algunos grupos de organismos fitoplanctónicos oceánicos forman “cocolitos”, magníficos caparzones microscópicos que los recubren y que al estar formados por carbonato cálcico constituyen uno de los sumideros de carbono más importantes.
2. FITOPLANCTON COSTERO: Constituido mayoritariamente por microalgas eucariotas grandes (diatomeas, dinoflagelados, clorofíceas...) viviendo en zonas en las que los nutrientes abundan estacionalmente debido a fenómenos oceanográficos como el upwelling o la circulación estuárica. En condiciones favorables proliferan hasta alcanzar densidades tan elevadas que llegan a cambiar la coloración del mar, como ocurre en las mareas rojas. En los períodos adversos dejan formas de resistencia que se acumulan en el sedimento y vuelven a germinar cuando las circunstancias son adecuadas. Aunque solo ocupan poco más del 8% de la superficie total del planeta en las zonas costeras podemos encontrar muchas de las áreas más productivas (contribuyendo con más del 12% de la producción primaria total de la Tierra) que constituyen los lugares de las grandes pesquerías.
3. FITOPLANCTON ENDOSIMBIONTE EN LOS CORALES: Se trata de un caso particular de fitoplancton costero que presenta unas características muy especiales. Son dinoflagelados de gran tamaño que viven como simbioses dentro de los corales (“zooxantelas”). Dado que la supervivencia de muchos corales aparece ligada a su relación simbiótica con estas microalgas, su papel en el cambio global puede ser muy relevante. Recordemos que pese a las colosales obras de la ingeniería civil humana, los enormes arrecifes de coral son con mucho las más ingentes obras del planeta movilizadas de carbonato cálcico. Así aunque los arrecifes de coral (y su fitoplancton simbiote) solo ocupan un 0.1% de la superficie planetaria, su aportación al secuestro de CO_2 es enorme. Recordemos además que los arrecifes coralinos constituyen la mayor reserva de biodiversidad del medio marino.

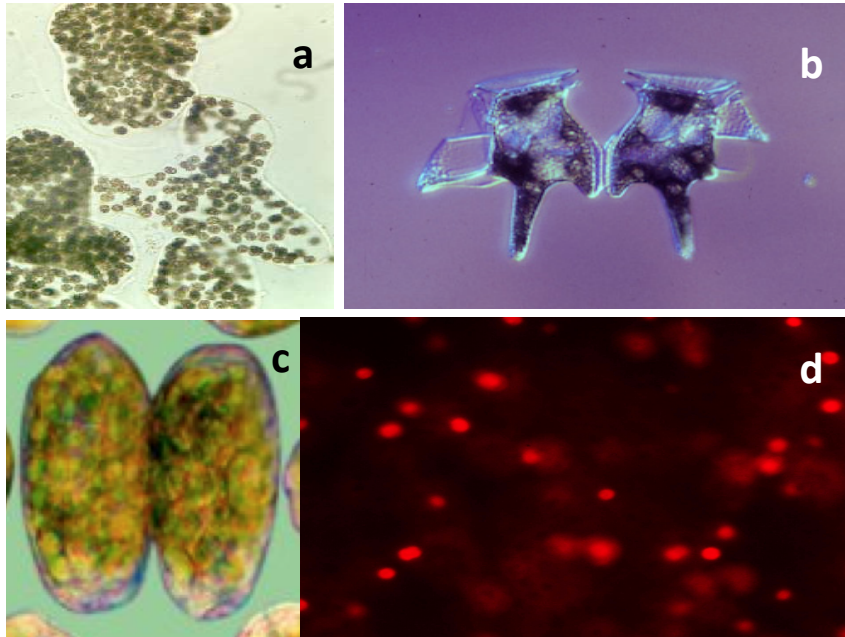


Figura 1. Diferentes grupos funcionales de fitoplancton: a) un ejemplo de fitoplancton continental (*Microcystis*); **b)** fitoplancton costero (*Dinophysis*); **c)** fitoplancton simbiótico de corales (*Symbiodinium*); **d)** fitoplancton oceánico (*Prochloron*).

4. FITOPLANCTON DE AGUAS CONTINENTALES: Además de los mares y océanos, aproximadamente el 1% de la superficie emergida del planeta está ocupada por aguas continentales (charcas, ríos, lagos, embalses). Las aguas continentales soportan ricas comunidades de organismos fitoplanctónicos muy diversos (cianobacterias, clorofíceas, diatomeas...) y muchas de ellas son extraordinariamente productivas. Las aguas continentales contribuyen a la producción primaria del planeta mucho más de lo que les corresponde por su superficie.

2.7. Principales amenazas que el cambio global plantea a los distintos grupos funcionales de organismos fitoplanctónicos: vislumbrando algunas consecuencias

El cambio global de origen antropogénico somete a los distintos grupos funcionales de organismos fitoplanctónicos a diferentes tipos de amenazas de las que por el momento ni tan siquiera comenzamos a tener una idea aproximada.

Así el fitoplancton oceánico, aunque habita una de las zonas del planeta donde menos se deja sentir la influencia humana, parece gravemente amenazado, puesto que se trata de organismos adaptados a vivir en un ambiente constante, sometido a muy pocos cambios y variaciones ambientales. A priori parece razonable pensar que estos organismos van a tener una limitada capacidad de adaptación al cambio global. Hoy en día existen evidencias de que parámetros ambientales vitales para el fitoplancton oceánico (como el pH o la temperatura) están cambiando lenta pero inexorablemente (aparentemente la superficie del mar se ha ido acidificando progresivamente como consecuencia del exceso de carbono liberado por la quema de los combustibles fósiles; también se va calentando progresivamente). Además las nuevas condiciones climáticas propiciadas por el cambio global podrían estar cambiando la circulación oceánica, alterando el

funcionamiento de las principales corrientes marinas, con unas consecuencias imprevisibles.

Por otra parte la mayoría de la población humana está asentada cerca de las zonas costeras marinas, por lo que resulta obvio que la influencia antropogénica en las zonas costeras y plataformas continentales resulta máxima. Como consecuencia de nuestro uso indiscriminado de la reacción de Haber para conseguir fertilizantes agrícolas, los humanos estamos eutrofizando significativamente estas áreas (lo que en principio debería aumentar su producción primaria y la fijación de CO₂). Por el contrario, algunas de las grandes obras civiles (presas, canalizaciones de agua, regadíos) han debilitado en muchos lugares la circulación estuárica disminuyendo enormemente la producción primaria. Así mismo los vertidos de nuevos contaminantes de origen antropogénico también parecen contribuir al descenso de la producción primaria del fitoplancton costero.

En particular los arrecifes coralinos y su fitoplancton parecen ser extraordinariamente sensibles al cambio ambiental. La mayoría de los parámetros asociados al cambio global (calentamiento, acidificación, contaminación, incremento de temperatura) tienen efectos catastróficos en estos organismos.

En las aguas continentales es donde la influencia humana resulta máxima: por un lado desecamos alguna de las más grandes extensiones de agua dulce del planeta como el Mar de Aral o el Lago Chad con consecuencias catastróficas; por otro creamos gigantescos embalses. Contaminación y eutrofización son una consecuencia generalizada del cambio global, tanto mas preocupante en cuanto a la extraordinaria velocidad a la que está ocurriendo.

2.8. La pregunta clave: ¿Cómo, cuándo y cuántos organismos fitoplanctónicos se adaptarán al cambio global? ¿Qué consecuencias tendrá para el futuro de la Biosfera?

Las diversas eras geológicas están separadas por eventos catastróficos de extinciones masivas: las faunas y floras dominantes de una época desaparecen bruscamente del registro fósil en episodios puntuales de rápidas extinciones masivas. Aunque la más “popular” de todas ellas fue la gran extinción Cretácica que acabó con los dinosaurios, existe un consenso paleontológico para bautizar a 5 grandes extinciones masivas (si bien existieron muchas más) y considerar que actualmente estamos inmersos en la sexta gran extinción de la que somos causantes. Los microfósiles muestran que en los períodos de grandes extinciones muchas de las líneas exitosas de organismos fitoplanctónicos se extinguieron. Es más, actualmente una serie de sólidas evidencias permiten afirmar que durante el período Neoproterozoico la fotosíntesis, anteriormente muy intensa, cayó prácticamente a cero en todo el planeta, manteniéndose así durante unos 70 millones de años tras la catástrofe neoproterozoica.

Sin embargo, pese a estas catástrofes siguen existiendo organismos fitoplanctónicos. Entre los más antiguos fósiles, con una edad de 3.700 millones de años aparecen organismos idénticos a las cianobacterias actuales. Sin duda muchos de los organismos fitoplanctónicos deberían ser capaces de sobrevivir al cambio global, salvo que los niveles de CO₂, vapor de agua, metano y otros gases de efecto invernadero alcanzasen en la atmósfera niveles tales que convirtiesen a la Tierra en un infierno ardiente, tal y como ocurre en el actual Venus.

Pero además el destino de la Tierra (desde pasar por una época de ligera fiebre hasta terminar abrasada en un infierno Venusino) va a depender en buena medida tanto de lo que hagamos los seres humanos como de lo que haga el fitoplancton: la mayoría de los meteorólogos y científicos planetarios apenas tiene dudas de que un relativamente ligero incremento en la temperatura media de la Tierra (de tal vez no mucho más de 5 °C) podría liberar la mayor reserva de metano (uno de los más efectivos gases de efecto invernadero) que en la actualidad se encuentra retenida en el fondo del mar en forma de clatratos de metano. Su liberación provocaría una irreversible catástrofe planetaria, ya que sus reservas son muy superiores a las reservas totales de petróleo y carbón. Nuestra capacidad para controlar la quema de combustibles fósiles por un lado, y la capacidad del fitoplancton para mantener o incrementar el funcionamiento del mecanismo de bomba biológica secuestrando carbono (recordemos que por el momento ya la mitad del carbono liberado por la quema de combustibles fósiles por el hombre se encuentra secuestrado de forma segura en el mar) decidirán sin duda nuestro destino.

Por lo tanto los estudios acerca de la reacción del fitoplancton frente al cambio global resultan primordiales. Desafortunadamente, los efectos del cambio global sobre el fitoplancton resultan extraordinariamente difíciles de predecir. En ecología del fitoplancton, existe una larga tradición en la cual la mayoría de los estudios se centran en la respuesta “fisiológica” que el fitoplancton es capaz de dar a diversos parámetros ambientales del cambio global (eutrofización, temperatura, acidez, contaminación..). Estos estudios, sin duda de extraordinaria importancia, a menudo no contemplan una condición fundamental: al tratarse de organismos vivos, el fitoplancton no se limita a seguir pasiva e inalterablemente un comportamiento predeterminado y repetible. Por el contrario, el fitoplancton dispone de la capacidad de evolucionar adaptándose activamente al cambio de las condiciones ambientales. Así, los estudios sobre la capacidad de adaptación del fitoplancton al cambio global cobran una importancia extraordinaria.

Desafortunadamente estos interesantes estudios son, por el momento, muy escasos (revisados por Sniegowsky (18)). Por todo esto, durante los últimos años nuestro grupo de investigación se ha dedicado a estudiar los mecanismos y capacidades de adaptación de diversos organismos fitoplanctónicos a diversos parámetros del cambio global. Repasaremos a continuación alguna de las evidencias que han ido apareciendo.

2.9. Algunas asunciones teóricas, consideraciones sobre el “estado del arte” y una pregunta decisiva

A priori cabría pensar que los distintos grupos funcionales de organismos fitoplanctónicos podrían tener capacidades de adaptación muy diferentes. Así parece lógico asumir que para los organismos fitoplanctónicos oceánicos o el fitoplancton simbiote de los corales, que llevan millones de años habitando en ambientes constantes, la capacidad de adaptarse rápidamente al cambio no sea prioritaria. Por el contrario, cabe esperar que los organismos fitoplanctónicos de aguas continentales así como los que forman el fitoplancton costero, expuestos a ambientes muy cambiantes e impredecibles, deberían disponer de una rápida capacidad de adaptación al cambio ambiental.

Así mismo los microorganismos en general y los microorganismos fitoplanctónicos en particular tienen poblaciones naturales con características biológicas tan peculiares que sin duda deberían tenerse muy en cuenta: la gran mayoría de las especies fitoplanctónicas son haploides, en ellas predomina la reproducción asexual (lo que da lugar a que sus poblaciones estén organizadas en forma de conjuntos de clones), presentan tamaños de población ingentes (con miles de millones de organismos), y tienen tiempos de generación muy cortos (en un mes el fitoplancton tiene tantas generaciones como los seres humanos en 1000 años) (19). Por el contrario, la mayoría de los trabajos en genética de poblaciones se han efectuado con organismos diploides con reproducción sexual, en poblaciones de pequeño tamaño (a menudo en especies en peligro de extinción) y con tiempos de generación mucho mayores que la de los organismos fitoplanctónicos (20).

Por tanto no es de extrañar que la comprensión del problema de cómo los microorganismos se adaptan al cambio ambiental sea una de las más interesantes historias de la biología (extensamente revisada en Sniegowsky (18) y Lensky & Sniegowsky (21): la visión Neo-Darwinista de que la adaptación de los microorganismos se logra mediante la selección de la variabilidad genética pre-existente (mutaciones que ocurren espontáneamente al azar antes de la exposición al agente selectivo y que se mantienen generalmente a bajas frecuencias en las poblaciones), que tan rápidamente se aceptó para explicar la evolución de animales y plantas, tardó mucho más tiempo en aceptarse para bacterias y protistas; por el contrario, muchos microbiólogos sostenían que la adaptación de los microorganismos se producía directamente en respuesta al agente selectivo mediante un proceso no Darwiniano (la expresión “las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos” resume perfectamente este punto de vista). Hoy en día muchos microbiólogos siguen defendiendo estos procesos sosteniendo la hipótesis de las mutaciones adaptativas que ocurren en respuesta a los agentes selectivos no letales (22, 23).

Entre la panoplia de organismos fotosintetizadores del plancton podemos encontrar desde primitivos procariontes como las cianobacterias hasta modernos eucariotes como clorofíceas o diatomeas y desde habitantes de ambientes tan extremos como el Río Tinto (que se utiliza como un modelo de estudio de exobiología) hasta fitoplancton oceánico viviendo en un ambiente muy poco variable. La pregunta clave es ¿Qué mecanismo les permitirá adaptarse al cambio global de origen antropogénico?

2.10. Obteniendo algunas respuestas

Creemos que la clave para entender los complejos mecanismos que permiten la adaptación de los organismos fitoplanctónicos al cambio ambiental podría comprenderse en buena parte siguiendo un estudio a diferentes niveles:

1º Dentro de ciertos límites, los microorganismos fitoplanctónicos podrían enfrentarse al cambio ambiental (p.e. un contaminante tóxico) mediante un proceso de aclimatación fisiológica, basado principalmente en la modificación de la expresión de sus genes.

2º Superados estos límites fisiológicos, los organismos fitoplanctónicos solo podrían adaptarse a un agente selectivo adverso (p.e. un contaminante tóxico) mediante la aparición de nuevas mutaciones que les confieran resistencia. Conocer

el mecanismo por el cual aparecen estas mutaciones que confieren resistencia (espontáneamente por azar antes de la exposición al agente tóxico versus inducidas de algún modo por el agente tóxico) es la clave para entender la adaptación de estos organismos fitoplanctónicos, ya que la evolución adaptativa depende del origen de nuevas mutaciones (18). Sorprendentemente apenas hay estudios (ni en organismos fitoplanctónicos ni en cualquier otro tipo de microorganismos) que analicen los mecanismos por los que aparecen las nuevas mutaciones adaptativas (p.e. las que confieren resistencia a un tóxico) ni que establezcan conexiones experimentales directas entre las tasa de aparición de estas mutaciones favorables y el proceso de adaptación, debido a las numerosas dificultades tanto prácticas como teóricas que se presentan a la hora de abordar el problema (revisado por Sniegowsky (18)).

3º Además parece relevante conocer cual es el papel que juegan (y jugarán) la adaptación, el azar y la historia en la manera con que los organismos fitoplanctónicos se enfrentan al cambio global. A este nivel una serie de interesantes experimentos de evolución rápida con bacterias contribuyen de manera esencial a clarificar la cuestión (24).

En este sentido durante los últimos 7 años hemos estudiado la adaptación de diversas especies de organismos fitoplanctónicos (tanto cianobacterias como microalgas eucariotas de distintos grupos funcionales -continentales, costeras, oceánicas-) al cambio global, utilizando dos modelos experimentales interesantes: El primero de ellos consiste en estudiar la adaptación de estos organismos fitoplanctónicos a contaminantes ambientales (tanto contaminantes antropogénicos de nueva síntesis como herbicidas, TNT, antibióticos..., como contaminantes presentes en toda la historia de la Tierra como cobre, cromo,...). El segundo consiste en analizar los mecanismos por los cuales las especies de fitoplancton neutrófilas son capaces de adaptarse rápidamente a ambientes naturales extremos (p.e. el Río Tinto, aguas termales,...). Complementariamente también investigamos los mecanismos que permiten la adaptación del fitoplancton a dos importantes parámetros del cambio global antropogénico: el incremento de temperatura y la eutrofización.

Para ello se emplearon diversas metodologías: en primer lugar el estudio de los límites de la aclimatación fisiológica se llevó a la práctica mediante estudios de dosis-efecto en los que se valoró el daño que concentraciones crecientes de tóxicos produjeron a los organismos fitoplanctónicos, tanto sobre diversos parámetros de la fotosíntesis como de manera especial sobre los componentes de eficacia biológica, principalmente sobre el parámetro malthusiano de la fitness (25, 26). Para estudiar los mecanismos genéticos que permiten la adaptación una vez superados los límites de la aclimatación fisiológica, empleamos una modificación del tradicional análisis de fluctuación de Luria-Delbruck, que nos permitió conocer no solo el modo de aparición de las mutaciones que confieren adaptación sino también sus tasas de mutación (27, 28). Además averiguamos la eficacia biológica de los mutantes adaptativos (componente wrightiano de la fitness) y el modo en el que se mantienen en las poblaciones mediante un equilibrio mutación-selección, empleando una serie de procedimientos de genética de poblaciones adaptados a organismos fitoplanctónicos (29, 30). Adaptamos los procedimientos de análisis de poblaciones ancestrales *versus* poblaciones derivadas de Lensky a las microalgas, para averiguar qué papel desempeñaba el azar, la adaptación y la historia en la

evolución rápida de organismos fitoplanctónicos en condiciones de incremento de la temperatura y la eutrofización (31). Por último empleamos procedimientos de “trinquete” que maximizan a la vez la aparición de mutantes y la selección direccional sobre ellos (y que empleamos a menudo en investigación aplicada, p.e. patente PCT/ES2008000465) para averiguar cuál es la máxima capacidad de adaptación al cambio global de los distintos grupos funcionales de organismos fitoplanctónicos.

Este conjunto de estudios generó una serie de sorprendentes resultados:

En primer lugar la capacidad de aclimatación fisiológica de los organismos fitoplanctónicos frente a contaminantes ambientales resultó ser bastante limitada. En general bastan dosis relativamente bajas de antibióticos, herbicidas, metales pesados u otros contaminantes antropogénicos para que en muy poco tiempo se inhiba totalmente la fotosíntesis y se impida su proliferación, produciéndose la muerte celular poco tiempo después (Tabla 1).

Análogamente, la aclimatación fisiológica no permitió adaptarse a casi ninguno de los múltiples ambientes extremos estudiados (la mayoría de las aguas extremas estudiadas contienen grandes concentraciones de metales pesados y un pH muy ácido). Tras analizar numerosas aguas ácidas así como aguas procedentes de zonas de fuerte actividad geotérmica de diversas partes del mundo, comprobamos que la mayoría de estas aguas inmediatamente inhiben la fotosíntesis y el crecimiento celular matando rápidamente a los organismos fitoplanctónicos (Tabla 2).

Tabla 1. Ejemplos de límites de la aclimatación fisiológica (analizados mediante estudios de dosis-efecto) de distintas especies de organismos fitoplanctónicos frente a diversos contaminantes antropogénicos.

Especie	División	Agente Selectivo	Dosis Letal	Fuente
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	DCMU (herbicida)	10 µMol	(27)
<i>Pseudanabaena planctónica</i>	Cyanoprokariota	DCMU (herbicida)	10 µMol	(28)
<i>Pseudanabaena planctónica</i>	Cyanoprokariota	Eritromicina (antibiótico)	10 µg ml ⁻¹	(28)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Chlorophyta	DCMU (herbicida)	10 µMol	(27)
<i>Scenedesmus spp.</i>	Chlorophyta	TNT (explosivo muy tóxico)	28 µg ml ⁻¹	(27)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	TNT (explosivo muy tóxico))	5 µg ml ⁻¹	(25)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Sulfato de cobre	5.8 µMol	(25)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Glyphosate (herbicida)	60 µg ml ⁻¹	(32)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Dodecyethyl dimetil-amonim bromide	21 µg ml ⁻¹	(33)
<i>Scenedesmus spp.</i>	Chlorophyta	Dodecyethyl dimetil-amonim bromide	118 µg ml ⁻¹	(33)

Así la limitada capacidad de aclimatación fisiológica que muestran la mayoría de los organismos fitoplanctónicos (incluso los más resistentes) no parece suficiente ni para conseguir que estos microorganismos se adapten a contaminantes de origen antropogénico, ni para explicar como consiguieron muchos de ellos adaptarse a proliferar en ambientes naturales extremos.

Tabla 2. Ejemplos de límites de la aclimatación fisiológica en diversos ambientes naturales extremos.

Especie	División	Ambiente extremo	¿Consiguen adaptación fisiológica?	Fuente
<i>Scenedesmus intermedius</i>	Chlorophyta	Vertido tóxico de lodos de Aznalcollar	No	(29)
<i>Spirogyra insignis</i>	Conjugatophyta	Aguas sulfurosas de La Hedionda	No	(34)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Río Tinto (ácido + metales pesados)	No	(35)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Río Tinto (ácido + metales pesados)	No	(35)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Mynydd Parys (UK) (ácido + metales pesados)	No	(36)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Río Agrio (ácido + metales pesados)	No	(37)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Bagno Vignoni (Italia) (aguas termales)	Sí	(38)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Amiana Marni (Italia) (aguas termales)	No	(38)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Infierno Sujo (Italia) (aguas termales)	No	(38)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Puzzoli (Italia) (aguas termales)	No	(38)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chlorophyta	Doña Sara (Argentina) (aguas termales)	Sí	(38)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Bagno Vignoni (Italia) (aguas termales)	Sí	(38)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Infierno Sujo (Italia) (aguas termales)	No	(38)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanoprokariota	Puzzoli (Italia) (aguas termales)	No	(38)

La aclimatación fisiológica no puede explicar la adaptación de organismos fitoplanctónicos ni a contaminantes antropogénicos ni a ambientes naturales extremos (en los que a menudo proliferan especies de fitoplancton). Por tanto deben existir mecanismos genéticos que expliquen estas adaptaciones. En realidad, la mayoría de los organismos fitoplanctónicos (y en especial especies de clorofíceas) son capaces de adaptarse tanto a contaminantes ambientales de origen antropogénico (Tabla 3) como a ambientes naturales extremos (Tabla 4) mediante un sencillo mecanismo genético de adaptación: la aparición de mutantes que les confieren resistencia. Sorprendentemente, la adaptación a estas condiciones adversas que superan con mucho sus límites de aclimatación fisiológica se produce casi siempre como resultado de una sola mutación que afecta a un solo locus. Además estas mutaciones que confieren resistencia siempre aparecen espontáneamente por azar y durante la fase de proliferación anterior a que los organismos se vean expuestos al agente selectivo, bien sea un contaminante antropogénico, bien un agua procedente de ambientes extremos.

Dado que estos raros mutantes que confieren resistencia aparecen espontáneamente antes de la exposición al agente selectivo (bien sea un contaminante antropogénico, bien sean aguas extremas) a tasas del orden de 10^{-6} a 10^{-8} mutantes por división celular (Tabla 3; Tabla 4), el siguiente paso es averiguar como se mantienen en las poblaciones de estos microorganismos antes de la exposición al agente selectivo. Comprobamos que en ausencia del agente selectivo, estos mutantes resistentes presentan menor eficiencia fotosintética, así como una menor tasa de reproducción que los genotipos salvajes sensibles. Por tanto presentan una eficacia biológica menor, lo que hace que en ausencia del agente selectivo (esto es cuando crecen en ambientes “normales” no contaminados ni extremos) sean eliminados más pronto o más tarde por efecto de la selección natural. Sin embargo como la mutación que permite aparecer organismos resistentes es recurrente, en las poblaciones de organismos fitoplanctónicos se producirá un equilibrio entre los nuevos mutantes resistentes que están apareciendo recurrentemente por mutación espontánea y los mutantes eliminados continuamente por efecto de la selección natural. Se llega así a un equilibrio en las poblaciones de organismos fitoplanctónicos en el que podemos encontrar del orden de un mutante resistente aproximadamente por cada millón de genotipos salvajes sensibles (Tabla 3, Tabla 4). Recordemos que las poblaciones de organismos fitoplanctónicos alcanzan tamaños ingentes. Así una reserva de un solo individuo resistente por cada millón, que pudiera parecer muy pequeña en una población por ejemplo de un mamífero amenazado, resulta ser una cantidad ingente para una población de organismos fitoplanctónicos.

Aparentemente, la simple aparición espontánea de mutantes resistentes y su mantenimiento en las poblaciones mediante un mecanismo de equilibrio mutación-selección parece asegurar que el fitoplancton resistirá sin problemas el cambio global más extremo. Esto parece fuera de toda duda, pero la pregunta fundamental (al menos desde nuestro punto de vista) es: ¿seguirá siendo la bomba biológica del fitoplancton uno de los principales mecanismos secuestradores del exceso de CO_2 atmosférico de origen antropogénico?

Existen una serie de indicios preocupantes que hacen pensar que la eficacia de la bomba biológica podría disminuir a medida que varíen las condiciones ambientales debido al cambio global: hasta la fecha las docenas de organismos

fitoplanctónicos resistentes de distintos grupos funcionales y taxonómicos que obtuvimos frente a decenas de contaminantes ambientales, incremento de acidez o temperaturas elevadas siempre mostraron un rendimiento cuántico de la fotosíntesis mucho menor que los genotipos sensibles.

En nuestros estudios más recientes estamos analizando la adaptación del fitoplancton a un incremento conjunto de temperatura y de eutrofización (31). En trabajos todavía no publicados comprobamos que si bien el fitoplancton es capaz de adaptarse a este cambio global mediante la selección de nuevos mutantes, aparecen una serie de resultados indeseables: la eficiencia fotosintética de los organismos que consiguen adaptarse disminuye (especialmente en el fitoplancton oceánico) y entre los organismos que mejor se adaptan a este cambio están los dinoflagelados formadores de las mareas rojas (tan dañinas para la acuicultura y pesquerías) y las cianobacterias continentales productoras de toxinas. Estos dos indicios experimentales, por un lado la pérdida de eficacia fotosintética y por otro la mayor facilidad de adaptación en organismos “HABs” (Harmful Algal Blooms), pudieran ser la explicación de dos fenómenos preocupantes de los que parecen encontrarse cada vez más indicios: una ligera pérdida de la fotosíntesis oceánica total y un gran incremento en la proliferación de mareas rojas y proliferaciones de cianobacterias tóxicas.

Recientemente investigamos si existe una capacidad diferencial de respuesta de los distintos grupos funcionales de organismos fitoplanctónicos en su capacidad de adaptación al forzamiento ambiental inducido por el hombre (40). Utilizamos un modelo que maximiza la presión de selección y la aparición de mutantes. Los resultados son relevantes: el fitoplancton oceánico presenta una capacidad de adaptación muy pequeña, seguido por el fitoplancton simbiótico de corales. En cambio el fitoplancton continental y costero es el que presenta mayor capacidad de adaptación. Sin embargo, el océano abierto ocupa la mayor parte de la superficie del planeta. El que sus habitantes sean los que presentan menor capacidad de adaptación al forzamiento ambiental antropogénico, no parece ser un dato halagüeño.

Por el momento nos encontramos lejos de poder dar respuestas seguras. Así las palabras de Paul Erlich que sirvieron de colofón al “Colloquium on the Future of Evolution” de la National Academic Science USA tienen en este sentido su máxima validez: *“More investigation is needed to make sound predictions about the future, and to determine actions to mitigate the biodiversity crisis”* (3). Si no somos capaces, podría ser que la ecuación de Drake¹ resultara cierta.

¹ Frank Drake calculó en su famosa ecuación el posible número de civilizaciones tecnológicas extraterrestres capaces de construir radiotelescopios que podría existir (tirando mucho por lo bajo). Su número era tan elevado que los científicos del programa SETI (que buscan inteligencia extraterrestre mediante radiotelescopios) se extrañaron de no encontrar ninguna. Entonces Drake introdujo un nuevo término en su ecuación: desde el momento en que una especie construye un radiotelescopio apenas le quedan unas décadas antes de que su influencia en el planeta la destruya. Ojalá se equivoque.

Tabla 3. Ejemplo de tasas de mutación (expresada en mutantes por división celular), coeficientes de selección contra el mutante resistente (s) y frecuencia a la que se mantienen en equilibrio mutación-selección los alelos resistentes en los ambientes sin contaminación. Valores extraídos de (25, 27, 28, 30, 38, 39).

Contaminante	Especie	Tasa de mutación	Coefficiente de selección	Frecuencia del mutante resistente
DCMU (herbicida)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	2.1×10^{-6}	0.46	2.1×10^{-3}
DCMU	<i>Pseudanabaena planktonica</i>	2.4×10^{-6}	0.84	1.6×10^{-3}
DCMU	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3.6×10^{-6}	0.80	2.1×10^{-3}
Glyphosate (herbicida)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3.6×10^{-7}	0.83	6.5×10^{-4}
Erythromycina antibiótico	<i>Pseudanabaena planktonica</i>	2.1×10^{-6}	0.82	1.6×10^{-3}
TNT (explosivo muy tóxico)	<i>Scenedesmus sp</i>	8.2×10^{-6}	0.83	3.1×10^{-3}
TNT (explosivo muy tóxico)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.4×10^{-5}	0.40	5.9×10^{-3}
Sulfato de cobre	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1.7×10^{-6}	0.76	1.5×10^{-3}

Tabla 4. Ejemplo de tasas de mutación para resistencia a ambientes naturales extremos (expresada en mutantes por división celular), coeficientes de selección contra el mutante resistente (s) y frecuencia a la que se mantienen en equilibrio mutación-selección los alelos resistentes. Valores extraídos de (35-38).

Aguas extremas	Especie	Tasa de mutación	Coefficiente de seleccion	Frecuencia del mutante resistente
Amiana Marmi (Italia)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	8.5×10^{-6}	0.73	1.2×10^{-5}
Amiana Marmi (Italia)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2.7×10^{-6}	0.92	2.9×10^{-6}
Pienza (Italia)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	2.0×10^{-6}	0.85	2.4×10^{-6}
Aguas Calientes (Argentina)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.3×10^{-5}	0.89	1.5×10^{-5}
Los Tachos (Argentina)	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	4.2×10^{-6}	0.85	4.9×10^{-6}
Los Tachos (Argentina)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	7.9×10^{-6}	0.86	9.2×10^{-6}
Río Tinto	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.4×10^{-6}	0.93	1.5×10^{-6}
Río Agrio	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.1×10^{-6}	0.95	1.2×10^{-6}
Mynydd Parys	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.6×10^{-6}	0.86	1.9×10^{-6}

3. CONCLUSIONES

3.1. Cada vez se acumulan más indicios sobre el modo en que diversas actividades humanas (quema de combustibles fósiles, síntesis de Haber...) están alterando la biosfera (eutrofización, calentamiento, fragmentación de hábitats..), produciendo un rápido cambio global, que está llevando a una grave crisis de biodiversidad (conocida como la 6ª gran extinción). Especialmente, la quema de combustibles fósiles ha liberado 450.000 megatoneladas de CO₂ a la atmósfera desde la revolución industrial, invirtiendo una tendencia sostenida probablemente durante los últimos 1.000 millones de años en los que la biosfera ha ido secuestrando CO₂ atmosférico mediante la fotosíntesis y acumulándolo en forma de carbón, petróleo...

3.2. Al menos la mitad del CO₂ liberado a la atmósfera desde la revolución industrial, ya ha sido “secuestrado” por el océano mediante diversos mecanismos entre los que destaca la llamada “bomba biológica” consistente en la captación fotosintética del CO₂ por los organismos fitoplanctónicos y su posterior transporte hasta el fondo marino a lo largo de la cadena trófica.

3.3. La captación del CO₂ atmosférico en el mar es muy heterogénea con algunas zonas que son un sumidero muy importante y otras zonas muy ineficaces. Sin embargo el destino final de esta captación del CO₂ (y por tanto en gran medida el destino de nuestro planeta) va a depender en buena parte de la capacidad que tengan los organismos fitoplanctónicos para seguir captando CO₂ al presente ritmo, incrementarlo o reducirlo.

3.4. Hay numerosos indicios de que el cambio global antropogénico está afectando al conjunto de los organismos fitoplanctónicos. Algunas consecuencias de las actividades humanas como la progresiva eutrofización contribuyen a incrementar la captación de CO₂ atmosférico, mientras que otras (como la contaminación la acidificación o el calentamiento) contribuyen a reducir esta captación. En estos tiempos de cambio rápido, el fitoplancton tiene que ser capaz de adaptarse al ritmo acelerado de los acontecimientos. En la medida que lo consigan la captación de CO₂ desde la atmósfera mediante la bomba biológica seguirá a un ritmo fuerte minimizando las consecuencias ambientales de la quema de combustibles fósiles.

3.5. Dentro de ciertos límites los organismos fitoplanctónicos consiguen aclimatarse fisiológicamente a este cambio. Superados estos límites tan solo se adaptan por mecanismos genéticos que confieren resistencia. Aparentemente el principal mecanismo es la aparición de nuevos mutantes resistentes a los efectos adversos de contaminantes, acidez, incremento de temperatura... Estos mutantes aparecen de forma espontánea por azar y a muy baja frecuencia sin que los agentes selectivos (contaminantes, bajo pH...) favorezcan para nada su aparición. Se mantienen en las poblaciones fitoplanctónicas a bajo número y aseguran la supervivencia de estos organismos. Sin embargo estos mutantes resistentes presentan una eficiencia fotosintética mucho menor que los genotipos sensibles (y también una menor tasa de proliferación), lo que podría reducir en un futuro la captación de CO₂ atmosférico por el océano. Además, las especies que parecen adaptarse mejor a este cambio global son las especies más dañinas, productoras de mareas rojas, proliferaciones masivas y toxicidad.

4. AGRADECIMIENTOS

La Dra. Emma Huertas mejoró significativamente este trabajo con sus ideas.

5. REFERENCIAS

1. Palumbi, S. R. (2001) Humans as world's greatest evolutionary force. *Science*. 293: 1786-1790.
2. Crutzen, P. J. & Stoermer, E. F. (2000) The Anthropocene. IGBP Newsletter 41, pp 12.
3. Ehrlich P. R. (2001) Intervening in evolution: ethics and actions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98: 5477-80.
4. Myers, N. & Knoll, A. H. (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 5389-5392.
5. Woodruff, D.S. (2001) Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 5471-5476.
6. Gore, A. (2007) Una verdad incómoda. La crisis planetaria del calentamiento global y cómo afrontarla. Editorial Gedisa. Barcelona.
7. Lovelock, J. (2006) La venganza de la Tierra: La teoría de Gaia y el futuro de la humanidad. Editorial Planeta. Barcelona.
8. Flannery, T. (2006) La amenaza del cambio climático. Historia y futuro. Ed. Taurus-Santillana. Madrid.
9. Weisman, A. (2007) El mundo sin nosotros. Random House Mondadori Ed. Barcelona.
10. Sagan, D. (1995) Biosferas. Metamorfosis del planeta Tierra. Alianza Editorial. Madrid.
11. Lovelock, J. (1983) Gaia una nueva visión de la vida sobre la Tierra. Hermann Blume Ediciones. Barcelona.
12. Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T. H., Kozyr, A., Ono, T. & Rios, A. F. (2004) The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*. 305: 367-371.
13. Bates, N. R. & Peters, A. J. (2007) The contribution of atmospheric acid deposition to ocean acidification in the subtropical North Atlantic Ocean. *Marine Chemistry*. 107: 547-558.
14. Huertas, I. E., Navarro, G., Rodríguez-Gálvez, S. & Lubian, L. M. (2006) Temporal patterns of carbon dioxide in relation to hydrological conditions and primary production in the northeastern shelf of the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 53: 1344-1362.
15. Navarro, G. & Ruiz, J. (2006) Spatial and temporal variability of phytoplankton in the Gulf of Cadiz through remote sensing images. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 53: 1241-1260.
16. Margalef, R. & Estrada, M. (1980) On upwelling eutrophic lakes the primitive biosphere and biological membranes. In: Richards, F. A. (ed.). *Coastal Upwelling*. Am. Geophys. Union. Washington D. C. pp. 522-529.
17. García, M & Losada, M. (1983) Conversión biológica de la energía solar. *Mundo Científico*. 26: 616-632.
18. Sniegowsky, P. D. (2005) Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*. 166: 360-362.
19. Costas, E. (1990) Genetic variability in growth rates in marine Dinoflagellates. *Genetica*. 83: 99-102.
20. Gould, S. J. (2002) *The structure of evolutionary theory*. Harvard University Press. Cambridge Massachussets.
21. Lenski, R. E. & Sniegowsky, P. D. (1995) "Adaptative mutation": the debate goes on. *Science*. 269: 285-288.
22. Cairns, J., Overbaugh, J. & Miller, J. H. (1988) The origin of mutants. *Nature*. 335: 142-145.
23. Foster, P. L. (2000) Adaptative mutation: implications for evolution. *Bioessays*. 22: 1067-1074.
24. Travisano, M., Mongold, J. A., Bennet, A. F. & Lenski, R. E. (1995) Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science*. 267:87-90.
25. 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. *Journal of Phycology*. 38: 1074-1081.

26. 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.
27. 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 *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*. 40: 391-398.
28. 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.
29. Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F. & Costas, E. (2002) Short-Term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37: 593-600.
30. García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez, L., López-Rodas, V. & Costas, E. (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algicide. *Water Research*. 38: 2207-2213.
31. Flores-Moya, A., Costas, E. & López Rodas, V. (2008) Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum* under simulated global change conditions. *Naturwissenschaften*. 95: 697-703.
32. López Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marvá, F., García, M. E. & Costas, E. (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evolutionary Ecology*. 21: 535-547.
33. Sánchez-Fortún, S., Marvá, F., D'Ors, A. & Costas, E. (2008) Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyl-dimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology*. 17: 229-234.
34. 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 Phytologist*. 166: 655-661.
35. 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.
36. López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008) Microalgal diversity in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environmental Experimental Botany*. 64: 43-48.
37. 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 (in press)*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.009
38. 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.* 180: 922-932.
39. López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marvá, 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.
40. Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V. & Costas, E. (2010) Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist*. 188: 478-487.

Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by small interfering RNAs in achondroplasia

Ana Guzmán-Aránguez¹, Laurence Legeai-Mallet², Jesús Pintor^{1*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. E. U. Óptica, Universidad Complutense de Madrid.

²INSERM U781, Université Paris Descartes-Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015. Paris, France.

Recibido el 21 de febrero de 2011.

* e-mail: jpintor@vet.ucm.es

ABSTRACT

Achondroplasia is a short-limbed dwarfism resulting from mutation and gain-of-function in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3). Effective therapy for this condition has not as yet been established. We have tested the efficiency of three different small interference RNAs (siRNAs) to abrogate the FGFR3 expression in human immortalized chondrocytes carrying the achondroplasia mutation (G380R). Two siRNA sequences induced markedly decrease of FGFR3 mRNA (up to 75% reduction) and protein levels (up to 61% reduction). Furthermore, siRNA-mediated knockdown of FGFR3 blocked the activation of the downstream signal transduction ERK pathway.

Keywords: Achondroplasia; chondrocytes; fibroblast growth factor receptor 3; RNA interference; ERK1/2.

RESUMEN

Inhibición del receptor FGFR3 por ARNs de interferencia para la acondroplasia

La acondroplasia es un tipo de enanismo caracterizado por extremidades cortas resultante de una mutación en el receptor de crecimiento de fibroblastos de tipo 3 (FGFR3). Aún no se ha establecido una terapia efectiva para esta enfermedad. Nosotros hemos testado la eficiencia de tres diferentes *small interference RNAs* (siRNAs) para bloquear la expresión del receptor FGFR3 en condrocitos humanos inmortalizados portadores de la mutación acondroplásica (G380R). Dos secuencias de siRNAs indujeron un marcado descenso de la expresión de ARN mensajero del receptor FGFR3 (hasta un 75%) así como de los niveles de proteína (hasta un 61%). Además, el bloqueo de la expresión del receptor FGFR3 mediado por los siRNAs redujo la activación de la cascada de transducción de las ERK.

Palabras clave: Acondroplasia; condrocitos; receptor de crecimiento de fibroblastos de tipo 3; ARN de interferencia; ERK1/2.

1. INTRODUCTION

Achondroplasia is the most common form of dwarfism in humans. This disorder is characterized by a mutation in the gene that encodes for the FGFR3 receptor, being the mutation in 97% of the patients a Glycine to Arginine substitution at position 380.

FGFR3 is a regulator of endochondral bone growth and its mutation causes gain of function disturbing chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification process. As a result, the rate of cartilage template formation and turnover required for bone elongation are dramatically reduced (1).

At the molecular level, sustained activation of mutant FGFR3 stimulates several intracellular signalling pathways, including extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) cascade and signal transducer and activators of transcription (STAT-1) pathway, that account for the critical changes in chondrocyte proliferation (2, 3), differentiation (4) and extracellular matrix homeostasis (5).

Potential therapeutic approaches have been proposed for achondroplasia treatment. The main strategies are based on blocking FGFR3 activation (6, 7) or interfering with the pathways that modulate the downstream propagation of FGFR3 signals (5, 8). However, despite the efforts, achondroplasia remains as an orphan pathology with no pharmacological treatment so far.

RNA interference is a posttranscriptional process triggered by the introduction of double-stranded RNA, which leads to gene silencing in a sequence-specific manner. This is one of the most exciting new findings in functional genomics of the past decade and its potential for experimental and therapeutic purposes is currently under investigation (9).

In this work, we transfected immortalized human chondrocytes carrying the heterozygous achondroplasia mutation (G380R) with three different small interfering RNAs (siRNAs) and analyzed their effect on FGFR3 expression and prolonged signalling to evaluate the therapeutical potential of siRNAs in achondroplasia treatment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cells

Immortalized human chondrocytes carrying the heterozygous achondroplasia mutation (G380R) were generated and characterized by Dr. Laurence Legeai-Mallet (10). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin and 500 ng/ml geneticin (all obtained from Invitrogen) and were incubated at 37 °C with 5% CO₂.

2.2. Small interfering RNA design and Transfection

Using siRNA design software, three siRNA duplexes targeting FGFR3 were obtained from Ambion (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The three sequences used are shown in Table 1. A scrambled siRNA without sequence homology to any known human gene was also obtained from Ambion and used as a

negative control to prove that silencing of the gene of interest is due to specificity of siRNA and is not due to non-specific effects.

Table 1. Small interfering RNAs (siRNAs) sequences.

siRNAs	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
SEQ 1	CCGUAGCCGUGAAGAUGCUTT	AGCAUCUUCACGGCUACGGTG
SEQ 2	CCUGCGUCGUGGAGAACAATT	UUGUUCUCCACGACGCAGGTG
SEQ 3	AGGUGUACAGUGACGCACATT	UGUGCGUCACUGUACACCTTG

Transfection complexes were prepared in an Opti-MEM serum free medium (Invitrogen) by mixing 7 µl of siPORT NeoFX transfection reagent (Applied Biosystems) and 300 nM of scramble/FGFR3 siRNAs. Immortalized human chondrocytes carrying the achondroplasia mutation were plated in a 6 well plate after the addition of transfection complexes. After 72h, RNA and protein were isolated to analyze knockdown efficiency.

2.3. Reverse Transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from the achondroplastic chondrocytes using the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the instructions of the manufacturer and 1 µg was reverse transcribed using SuperScript III First-Strand synthesis system Kit (Invitrogen).

The FGFR3-specific primers (forward 5'- TGCTGAATGCCTCCCACG -3' and reverse 5'- CCAGGCTCCACTGCTGATG -3') that have been previously described (11, 12) were employed for amplification of FGFR3. Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control and GAPDH-specific primers (forward 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' and reverse 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3') were purchased from Clontech (Clontech, Mountain View, CA, USA). Reactions were performed using TITANUM Taq DNA polymerase (Clontech). For FGFR3 amplification, reactions conditions were 94 °C for 3 minutes, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 minute, 60 °C for 1 minute, and 72 °C for 10 minutes. The thermal cycling conditions for GAPDH amplification were 94 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 94 °C for 45 seconds, 60 °C for 45 seconds, 72 °C for 2 minutes and 72 °C for 7 minutes.

PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel, stained by ethidium bromide and quantified using a Kodak GL 200 Imaging system and Kodak Molecular Imaging software (Kodak, Rochester, NY, USA). The values of the ratio of FGFR3 to GAPDH were calculated and normalized by scramble control when the value of scramble control was defined as 100%.

2.4. Western Blot Analysis

Total protein from achondroplastic chondrocytes transfected with the siRNAs were isolated using the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel) and protein concentration was determined by the Protein Quantification assay (Macherey-Nagel).

15 µg of protein from each sample were subjected to 10% SDS-polyacrilamide gels and were transferred to nitrocellulose membranes. Thereafter membranes were blocked and incubated overnight with anti-FGFR3 (1:100) or pERK1/2 (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After washing, blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody. Development was performed using ECL system (Amersham, Buckinghamshire, UK). To verify equal loading, membranes were stripped in 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS and 100 mM 2-mercaptoethanol and re-blotted with the antibodies GAPDH (1:2,500) (Abcam, Cambridge, UK) and ERK2 (1:2,000) (Santa Cruz Biotechnology). Films were scanned and a densitometric analysis was performed using Kodak GL 200 Imaging system and Kodak Molecular Imaging software. The intensity of the bands quantified by densitometry was graphed. Data were normalized by FGFR3 protein levels of the scramble control, defined as 100%. In the case of ERK1/2 phosphorylation, data were normalized by ERK1/2 phosphorylation levels of the scramble control, defined as 100%. All the data shown are representative of three independent experiments.

2.5. Statistical Analysis

The differences between the mean values were analyzed with InStat3 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) using ANOVA test; statistical significance was considered to be achieved at the $P < 0.05$ level.

3. RESULTS

3.1. Silencing of FGFR3 in human achondroplastic chondrocytes by siRNAs

siRNAs were transfected into human achondroplastic chondrocytes and 72 h later the ability of the selected siRNA sequences to knockdown FGFR3 mRNA and protein levels was analyzed by RT-PCR and Western Blot, respectively (Figure 1). Of the three siRNA sequences tested in achondroplastic chondrocytes, sequences 1 and 2 showed 55% and 75% knockdown of FGFR3 mRNA expression, respectively, as compared to scramble control (Figure 1A). siRNA sequence 3 was less effective at reducing FGFR3 mRNA expression and only 38% reduction was detected.

Western blot analysis of cell culture lysates from these cells revealed that the amount of FGFR3 protein also decreased (Figure 1B). In particular, densitometry of immunoblots indicated that FGFR3 protein was reduced by 52% and 61% with sequence 1 and 2, respectively. Once more, the sequence 3 induced a lower decrease as compared to the scramble control (20% of reduction).

3.2. Effect of FGFR3 knockdown on ERK1/2 activation

To investigate the impact of FGFR3 silencing on downstream signalling, the phosphorylation status of ERK1/2 was evaluated (Figure 2). siRNA sequence 2 reduced ERK1/2 phosphorylation by 41% as compared to scramble control levels. Although to a lesser extent, siRNA sequence 1 also decreased the levels of phosphorylated ERK1/2 (27% of reduction), whereas siRNA sequence 3 hardly modified the degree of phosphorylation of ERK1/2 when compared to scramble control.

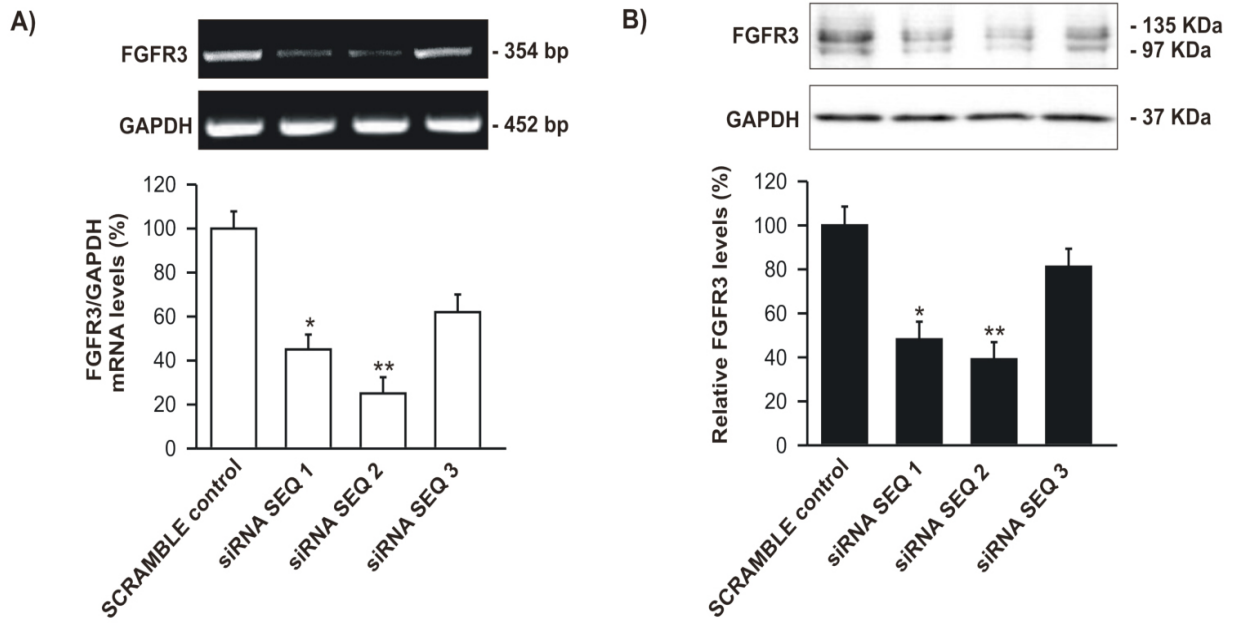


Figure 1. FGFR3 expression after siRNA transfection. siRNAs were introduced into human achondroplastic chondrocytes and FGFR3 mRNA (A) and FGFR3 protein (B) were assessed 72 h later. *P < 0.05, **P < 0.01.

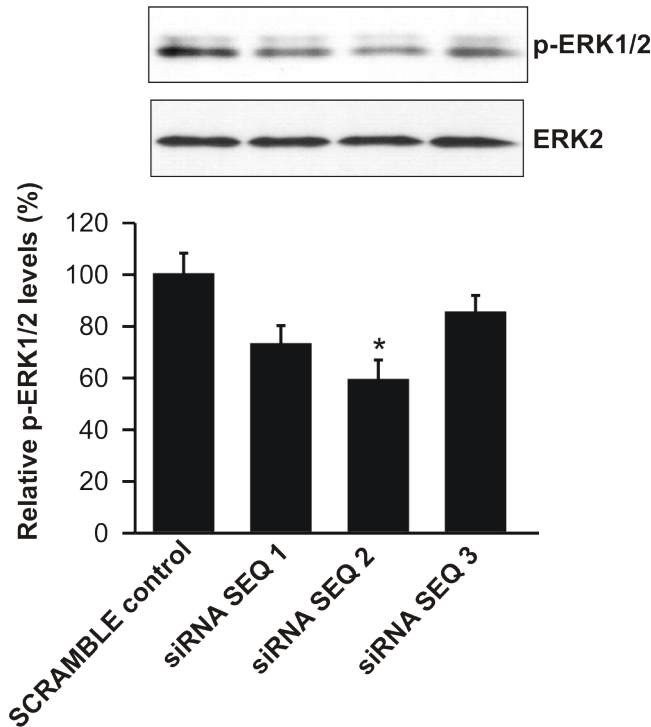


Figure 2. Effect of FGFR3 knockdown on ERK1/2 phosphorylation. Cell lysates of human achondroplastic chondrocytes transfected with siRNAs were successively immunoblotted with anti-pERK1/2 and anti-ERK2 antibody to verify equal loading. *P < 0.05.

4. DISCUSSION

RNA interference is emerging as a strategy for the highly specific suppression of gene expression, both *in vitro* and *in vivo*. The present work shows the use of siRNA duplexes targeting FGFR3 to knockdown the mRNA and protein expression levels of this receptor in immortalized human chondrocytes carrying the achondroplasia mutation (G380R).

Our results are consistent with previous studies demonstrating that siRNAs targeting distinct mRNA sequences results in different silencing efficiency (11, 13). A significant decrease of FGFR3 mRNA and protein levels was observed after transient transfection with siRNA sequences 1 and 2, while the siRNA sequence 3 did not induce FGFR3 down-regulation in the same extent.

Activation of FGFR3 results in trans-autophosphorylation of juxtaposed intracellular kinase domains with subsequent recruitments of signalling molecules leading to phosphorylation and activation of different signalling pathways. Therefore, we determined whether these signalling pathways were also affected by FGFR3 knockdown. In particular, we have analyzed one of the best known and characterized downstream signal transduction pathways coupled to FGFR3, the ERK mitogen activated protein kinase cascade. The sustained activation of this pathway is involved in the inhibitory effect of FGF signalling on chondrocyte proliferation and cartilage matrix production (3, 5). FGFR3 knockdown by siRNAs (siRNAs sequence 1 and 2) attenuated the ERK1/2 phosphorylation suggesting that the negative effects mediated by this pathway could be counteracted by siRNAs targeting FGFR3.

RNA interference strategies have been previously described in different types of cancer cells that have activating mutations in FGFR3. In bladder cancer cells, knockdown of FGFR3 by siRNAs lead to decrease proliferation, reduced clonogenicity and soft agar growth (14). Similarly, siRNA-mediated knockdown of FGFR3 inhibited anchorage-independent growth of adrenal carcinoma cells (12). Inhibition of FGFR3 expression by RNA interference has been also reported in multiple myeloma cells (11). On the other hand, regarding skull and skeletal growth disorders, RNA interference to knock-down the expression of a mutant FGFR2 has been used in Apert syndrome, a classic severe form of craniosynostosis (15). However, to our knowledge we have shown for the first time the use of RNA interference targeting FGFR3 in human achondroplastic chondrocytes.

Although several therapeutic approaches have emerged for achondroplasia treatment, the translation of these therapies into the clinic has not taken place. One of the main troubles for the success of new therapies is the delivery of compounds to growth plate chondrocytes of cartilage. The avascular nature of the cartilage tissue represents a challenge for drug delivery. Conjugation of siRNAs with small molecules that posses affinity for cartilage or chondrocytes could facilitate the target to growth plate chondrocytes of cartilage. In this sense, several strategies have been developed to promote cell/tissue-specific siRNA delivery (16). Additionally, the dense extracellular matrix that surround chondrocytes form an important barrier for drug delivery. However, siRNAs are small enough that diffusion through extracellular matrix should not be an issue.

5. CONCLUSION

Our findings indicate that RNA interference targeting FGFR3 could be a promising therapeutic option for achondroplasia in the future. Hopefully, new advances in delivery strategies to growth plate chondrocytes of cartilage will facilitate the development of siRNA-based therapy.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by research grants from Fundación Ramon Areces (ACHONDROPLASIA), Fundación Magar and Fundación AFAPA.

7. REFERENCES

1. Horton, W. A., Hall, J. G. & Hecht, J. T. (2007) Achondroplasia. *Lancet*. 370: 162-172.
2. Sahni, M., Raz, R., Coffin, J. D., Levy, D. & Basilico, C. (2001) STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development*. 128: 2119-2129.
3. Raucchi, A., Laplantine, E., Mansukhani, A. & Basilico, C. (2004) Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 1747-1756.
4. Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. & de Crombrughe, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 18: 290-305.
5. Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M., Tamura, N., Ogawa, Y. & Nakao, K. (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.* 10: 80-86.
6. Aviezer, D., Golembo, M. & Yayon, A. (2003) Fibroblast growth factor receptor-3 as a therapeutic target for Achondroplasia--genetic short limbed dwarfism. *Curr. Drug Targets*. 4: 353-365.
7. Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A. & Rothe, C. (2003) Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J. Biol. Chem.* 278: 38194-38205.
8. Guzman-Aranguéz, A., Crooke, A., Yayon, A. & Pintor, J. (2008) Effect of PPADS on achondroplastic chondrocytes: inhibition of FGF receptor type 3 over-activity. *Eur. J. Pharmacol.* 584: 72-77.
9. Behlke, M. A. (2006) Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther.* 13: 644-670.
10. Benoist-Lasselín, C., Gibbs, L., Heuertz, S., Odent, T., Munnich, A. & Legeai-Mallet, L. (2007) Human immortalized chondrocytes carrying heterozygous FGFR3 mutations: an in vitro model to study chondrodysplasias. *FEBS Lett.* 581: 2593-2598.
11. Zhu, L., Somlo, G., Zhou, B., Shao, J., Bedell, V., Slovak, M. L., Liu, X., Luo, J. & Yen, Y. (2005) Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 4: 787-798.
12. Estes, N. R., Thottassery, J. V. & Kern, F. G. (2006) siRNA mediated knockdown of fibroblast growth factor receptors 1 or 3 inhibits FGF-induced anchorage-independent clonogenicity but does not affect MAPK activation. *Oncol. Rep.* 15: 1407-1416.
13. Sharp, P. A. (2001) RNA interference--2001. *Genes Dev.* 15: 485-490.
14. Tomlinson, D. C., Hurst, C. D. & Knowles, M. A. (2007) Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene*. 26: 5889-5899.
15. Shukla, V., Coumoul, X., Wang, R. H., Kim, H. S. & Deng, C. X. (2007) RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat. Genet.* 39: 1145-1150.

16. Manjunath, N. & Dykxhoorn, D. M. (2010) Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov.* 9: 418-430.
-

MEMORIA DE SECRETARÍA CURSO 2010**Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2010****Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo**

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

Nuestra Corporación inicia oficialmente sus actividades correspondientes al Curso 2010 con la Solemne Sesión Inaugural, en este caso celebrada el 21 de Enero, bajo la presidencia de la Excmo. Sra. D^a M^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Academia. Estuvieron presentes, el Presidente del Instituto de España, Excmo. Sr. D. Salustiano del Campo Urbano, el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Miguel Ángel Alario Franco; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo. Sr. D. Manuel Díaz-Rubio García y los Presidentes de las Academias de Farmacia de Cataluña, y Galicia y el vicepresidente de la Iberoamericana.

El discurso inaugural estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. José Miñones Trillo, en representación de la sección primera, de Química y Física, titulado: “Anecdotario de los primeros años de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela (Siglo XIX): un recuerdo a sus profesores y alumnos distinguidos”.

Presidido por Sus Majestades los Reyes de España, Don Juan Carlos I y Doña Sofía, acompañados por el Ministro de Educación D. Ángel Gabilondo y la Presidenta de la RANF, Doña María Teresa Miras Portugal, se celebró el 6 de octubre en nuestra sede, el solemne acto de apertura del curso de las Reales Academias del Instituto de España. Tomó en primer lugar la palabra la Presidenta de nuestra Corporación. En su intervención, puso de manifiesto el agradecimiento de la Academia por la presencia de Sus Majestades. Por otra parte, puso énfasis en el papel de

las Academias como transmisoras del conocimiento a las futuras generaciones y en el esfuerzo realizado por éstas para abrirse a la Sociedad. El Académico Secretario de la RANF, en representación del Instituto de España, leyó el informe de las actividades del pasado curso de las Academias integradas en aquel. La lección inaugural estuvo a cargo de nuestro académico de número Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato, que habló de los fármacos indicando que el principio activo, componente fundamental de estos, debe estar en armonía con las propiedades terapéuticas. También, se refirió a la importancia de la liberación de los medicamentos como instrumento de regulación de la dosis. El Ministro de Educación D. Ángel Gabilondo, agradeció el apoyo de la Corona a las Reales Academias expresando su gratitud por el trabajo realizado. También, mencionó la entrada en vigor del Real Decreto del 17 de Septiembre por el que se refunda el Instituto de España y que, según el Ministro, mejorará la capacidad de autogobierno de las Reales Academias. Finalmente y para cerrar el acto tomó la palabra Su Majestad el Rey D. Juan Carlos I. En su intervención, hizo mención del respeto de la corona hacia las Reales Academias y felicitó a los nuevos académicos que tomaron posesión el curso pasado y tuvo un recuerdo para los que nos dejaron. En este sentido hizo alusión a D. Juan Manuel Reol como anterior presidente de la RANF. Refiriéndose concretamente a nuestra Institución, puso de manifiesto su brillante trayectoria en la transmisión del conocimiento, mencionando expresamente la digitalización del archivo histórico y el portal multimedia. También se refirió a la renovación de los estatutos y a la labor realizada por D. Salustiano del Campo al frente del Instituto de España, así como al nuevo presidente D. Víctor de la Concha y al secretario general D. Pedro García Barreno. El acto terminó declarando el Rey inaugurado el nuevo curso 2010-2011.

Dentro de este capítulo de inauguraciones, el 13 de enero se celebró en el salón de Actos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Biológicas de París, la sesión solemne de comienzo del curso 2010 en la Academia Nacional de Farmacia de Francia al que por primera vez se invitó a nuestra Academia, representada por nuestra Presidenta. En dicho acto impartió la conferencia inaugural el profesor Luc Montaigner, galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año

2008 por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana, el virus del SIDA. Estas buenas relaciones con la Academia Francesa tuvieron su continuidad con una reunión posterior en nuestra sede en la que dentro de un ambiente de máxima cordialidad, se firmó un acuerdo de cooperación mutua, y se invitó a dicha Academia al acto Real de inauguración del curso 2010.

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

La Excma. Sra. D^a. María José Alonso Fernández, Catedrática de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela tomó posesión el 17 de junio en Sesión Solemne de la medalla nº 26, leyendo su discurso reglamentario titulado: “Ciencia y salud global: la brecha del desarrollo”, que fue contestado por el académico de número Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato.

Se produjeron tres tomas de posesión de académicos correspondientes extranjeros, la del Prof. Kazuhide Inoue, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Profesor del Departamento de Farmacología Molecular y Sistemas, en la Kyushu University, de Japón y a la que asistió el Embajador de Japón en España, Excmo. Sr. Fumiaki Takahashi, que además inauguró nuestra sala dedicada al arte japonés ukiyo-e; la del Prof. Henri R. Manasse, Vicepresidente ejecutivo de la American Society of Health-System Pharmacists (USA) y la de la Dra. Cristina Rondinone, Directora de investigación y Jefe del Departamento de Enfermedades Metabólicas de Hoffmann-La Roche.

Además, el 16 de diciembre, el Pleno de la Corporación eligió a dos nuevos Académicos de Número por el turno de Farmacia, en las personas de Rosa Basante Pol, profesora de Historia de la Farmacia, José María Medina Jiménez, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca (USAL) e investigador del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y a María Vallet Regí, catedrática de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Universidad Complutense, por el turno de Ciencias afines, siendo la primera mujer que ocupa una plaza en nuestra Academia por ese turno. Además, el Dr. Mariano Barbacid fue elegido Académico de Honor.

Abierta durante el curso la admisión de nuevos académicos correspondientes nacionales, la Junta de Gobierno eligió por unanimidad y después de cumplir los trámites regulados en la convocatoria a los siguientes miembros: Antonio Isacio González Bueno, José M^a Ordovás Muñoz, Lina Badimón Maestro, Antonio Jesús Salinas, Ángela M^a Martínez Valverde, Carmen Aragón Rueda, Pilar Gómez Serranillos, María Molina Martín, José Javier Lucas Lozano, Francisco Sánchez Madrid, Pedro Guillén García, Miguel Ladero, Jorge Camarasa García, Luis Rivera de los Arcos, Manuel Guzmán Pastor, Sebastián Cerdán García-Esteller y Francisco Bolás Fernández. Además, elegidos por la Junta General lo fueron los Académicos Isaac Arias, José Antonio Rodríguez Montes y Josep Ventura Ferrero y como académicos correspondientes extranjeros los Dres. Christoph Friedrich, Maiken Nedergaard y Clement Sánchez.

Durante el año 2010, han sido reelegidos vicepresidente el Excmo. Sr. D. Antonio Martínez Fernández y vicesecretario el Excmo. Sr. D. José Miguel Ortiz Melón y como nuevo Presidente de la sección sexta, el Excmo. Sr. D. César Nombela Cano.

Durante el curso 2010, tuvimos que lamentar las pérdidas de nuestros académicos correspondientes, Margarita Lorenzo Balado y Juan Hernando Costa, de los académicos extranjeros Prof. Ritschel y Manfred Anke y de Nicolás Forteza, medalla de plata Carracido.

La actividad científica de la Academia, se puede cuantificar en un total de 32 Sesiones Científicas semanales, distribuidas en 4 Tomas de Posesión, 19 conferencias, 7 Mesas Redondas, la presentación de la monografía 29 y la tradicional sesión conmemorativa de los Premios Nobel, en las que intervinieron destacados científicos, como Mariano Barbacid, Pedro Barri Ragué, Jefe del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción del Instituto Universitario Dexeus y pionero en la reproducción asistida; Gonzalo Nieto Feliner, Director del Real Jardín Botánico de Madrid; Icíar Astiasarán Anchía, Decana de Farmacia de la Universidad de Navarra; José Javier Lucas, Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa; José Manuel Bautista Santacruz, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV en la Facultad de

Veterinaria de la UCM; María Blasco del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas; Francisco Sánchez Madrid, Jefe de Sección y Catedrático de Inmunología del Hospital Universitario La Princesa, Enrique Fernández-Caldas Rodríguez, Director Científico de Laboratorios Inmunotek y María Amelia Martins-Louçao, Vice-Rectora de la Universidad de Lisboa, entre otros.

El 10 de noviembre se celebró en nuestra sede la Jornada sobre Innovación terapéutica y factores de protección frente a la enfermedad de Alzheimer, donde se impartieron dos conferencias. La primera titulada “Innovación terapéutica frente a la enfermedad de Alzheimer” fue impartida por el Dr. Jesús Benavides Yanguas, consultante en Neurofarmacología. La segunda conferencia titulada “¿Existen factores protectores frente a la enfermedad de Alzheimer?” fue impartida por el Dr. Pablo Martínez Martín, Director Científico de la Unidad de Investigación Proyecto Alzheimer de la Fundación Reina Sofía.

El Defensor del Pueblo, Enrique Múgica, impartió el 5 de mayo una conferencia en nuestra sede, dentro de los actos que fueron organizados por 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.

En el capítulo de publicaciones, y debido al recorte presupuestario oficial, fue preciso limitar el número de aquellas, aún así editamos 3 monografías, las 29, 30 y 31, tituladas: “Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros”; “Biomarcadores: analítica, diagnóstico y terapéutica” y “Acción de las hormonas a nivel cerebral” y 3 números de los Anales.

La Fundación Casares Gil como es habitual, vuelve a estar presente en estas actividades de la RANF, destacando el patronazgo de todas estas monografías y la publicación de los números 8, 9 y 10 de la colección Lecturas singulares: “Sinopsis bioclimática de la tierra y mapas bioclimáticos de Suramérica”; “La demencia de un rey: Fernando VI (1746-1759)” y “Agua, fuente de vida”.

Del 15 al 18 de Febrero se celebró en la sede del Instituto de España el curso: “Acción de las hormonas a nivel cerebral” coordinado por la Dra. Ana María Pascual Leone. El curso que fue de una gran aceptación, contó asimismo con una gran asistencia de público. En el mismo participaron importantes personalidades del mundo de la neurociencia actual, entre los que citamos a José M^a Medina Jiménez, Enrique Blázquez Fernández y Juan Bernal Carrasco.

En nuestro constante deseo de ofrecer mas servicios a la Sociedad, nuestra Academia ha inaugurado su canal de TV Web privado en ranf.tv, donde se retransmiten en directo y en alta definición nuestras sesiones, que también se ofrecen en diferido y que cuenta de momento, con 5 canales: conferencias, documentales, entrevistas, homenajes y recepciones.

Además, durante el año 2010, la empresa DIGIBIS, digitalizó nuestras obras más antiguas conservadas en la Biblioteca dentro del proyecto subvencionado por el Ministerio de Cultura y que ya se encuentran disponibles online.

Durante la sesión inaugural del curso 2010 de la RANF se entregaron dos medallas Carracido a título póstumo y en su categoría de oro a nuestros académicos de número Excmos. Sres. D. Antonio Doadrio López y D. Juan Manuel Reol Tejada, recogidas por sus viudas y otra en su categoría de plata a D. Daniel Pacheco.

Nuestra Academia, también está abierta para colaborar en otros foros, fuera de su sede y en representación de la misma. De esta manera, el que suscribe, impartió una conferencia sobre el calentamiento global, en el Ateneo de Madrid; las académicas María Cascales Angosto y Flora de Pablo Dávila organizaron un curso de gran éxito sobre “Células madre y terapia regenerativa” en la sede del Instituto de España, al igual que el Curso de Avances en Neurociencias, coordinado por la Excma. Sra. D^a M^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de esta Corporación. Finalmente, el Dr. Bartolomé Ribas Ozonas, impartió una conferencia en la sede de la Real Academia Nacional de Medicina, sobre “Metalotioneína y elementos minerales en la osteoporosis” en la conmemoración del “Día Mundial de la OMS de la Osteoporosis”.

En el capítulo de honores destacar que nuestra Académica de Número, la Doctora María Cascales Angosto, ha recibido el título de “Hija Predilecta de Cartagena”, en un acto celebrado el 23 de abril 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», como subrayó 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. También, y por el Ministro de Trabajo, Celestino Corbacho, se le entregó el 29 de junio en Madrid, la Medalla de Oro al Mérito en el Trabajo. La Dra. Cascales dijo: “No sé si el concepto bíblico de trabajo tal como Dios lo introdujo en el Paraíso Terrenal cuando castigó a Adán con la sentencia “trabajarás con el sudor de tu frente” puede aplicarse a mi. La Investigación Bioquímica a la que he dedicado mi vida activa, me ha producido gratificaciones inmensas, de tal manera que me han llevado a sentir por ella verdadera adicción. Hoy, ya jubilada, es mucho lo que añoro la mesa de laboratorio y los experimentos de cada día... y trato de seguir ocupada en temas de mi especialidad para sentirme viva”.

El 26 de abril, ingresó en la Real Academia de Farmacia de Cataluña como académico correspondiente el Excmo. Sr. D. 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”. La Presidenta de nuestra Corporación, Excma. Sra. D^a M^a Teresa Miras Portugal, ha sido nombrada “Farmacéutica ejemplar” por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. Recibió el galardón de manos de la Presidenta de la Asociación de Antiguos de dicha Facultad, Dña. Asunción Lamas.

Nuestro Académico de Número, Prof. Dr. Benito del Castillo ha sido nombrado Presidente de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española, que depende de la Agencia del Medicamento del Ministerio de Sanidad y Política Social. En esta prestigiosa Comisión ha sido designada vicepresidenta primera nuestra Académica Gloria Frutos y vocal de ella el Prof. Fidel Ortega, también Académico de esta Institución. Además, el Dr. del Castillo, ha sido nombrado Académico Honorario y padrino de la Academia de Farmacia de Paraguay. El Profesor Ángel Villar del Fresno, Académico de Número de esta Institución, fue galardonado el 16 de septiembre en la Asamblea General del XXIX Congreso Internacional celebrado en Granada, con la medalla Canals, el más alto honor que concede la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino. También se le concedió el título de “Presidente de Honor del Grupo Español”, mientras que el Prof. Sellés Flores, que también está en posesión de la medalla Canals, fue elegido Presidente General de dicha Sociedad. La Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino es una sociedad internacional constituida por tres grupos nacionales: español, francés e italiano y reúne por tanto a farmacéuticos de estos tres países. Desde su fundación en 1953, ha tenido como objetivo primordial establecer una colaboración científica, profesional y cultural entre farmacéuticos, y profesionales relacionados con las ciencias farmacéuticas.

Finalmente, el Prof. Federico Mayor Zaragoza, ha sido nombrado Presidente de la Comisión internacional contra la pena de muerte.

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

Por último, tenemos que hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación por las subvenciones concedidas en el Curso 2010, que nos han permitido acometer las actividades programadas. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Fundación Ramón Areces, a todos los patrocinadores del Concurso Científico, y a los Patronos y miembros de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación y a nuestro Académico de Número Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, por la donación de la obra Alcubierre.

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

Muchas gracias por su atención.

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO.
Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia.

SESIONES CIENTÍFICAS

3 de marzo

Conferencia de la Dra. Eva Delpón Mosquera, Académica Correspondiente de la RANF, titulada: “Los canales cardiacos con rectificación interna. Nuevos efectos de los viejos antiarrítmicos”.

10 de marzo

Conferencia del Dr. Antonio Alcamí, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, titulada: “Buscando nuevos virus en ecosistemas extremos de la Antártida”.

17 de marzo

Toma de Posesión como Académica Extranjera de la Dra. Maiken Nedergaard, Decana de la Facultad de medicina de Rochester y co-directora del centro de trasplantes de la misma universidad, quien pronunció su discurso titulado: “Glia: the other cell in brain”.

17 de marzo

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. José M^a. Ordovás, Director del Departamento de Genética en la Universidad de Tufs, USA, quien pronunció su discurso titulado: “Las nuevas tecnologías ómicas claves en la personalización de la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular”.

24 de marzo

Mesa Redonda sobre Patologías Duales. Presentada por la Excma. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la RANF. Participaron como ponentes: El Dr. Néstor Szman, Psiquiatra en el Hospital Virgen

de la Torre de Madrid y Presidente de la Sociedad Española de Patología Dual: “Patología dual y la esquizofrenia dual en el contexto de las neurociencias” y la Dra. M^a Isabel Colado, Catedrática del Departamento de Farmacología en la Facultad de Medicina de la UCM: “Esquizofrenia dual. ¿Los mismos antipsicóticos?”

31 de marzo

Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Dra. Lina Badimón Maestro, Profesora de Investigación del CSIC y Directora del Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), quien pronunció su discurso titulado: “Patología Molecular y celular de la Aterosclerosis y Síndromes Isquémicos agudos”. Fue presentada por el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez, Académico de Número de la RANF.

7 de abril

Toma de Posesión de Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Antonio Jesús Salinas, Dpto. de Química Inorgánica y Bioinorgánica en la Facultad de Farmacia de la UCM: “Diseño de biomateriales de última generación para liberación controlada de fármacos”. Le presentó el Excmo. Sr. D. Antonio L. Doadrio Villarejo, Académico Secretario de la RANF.

7 de abril

Toma de Posesión de Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Clément Sánchez, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Université Pierre et Marie Curie, Collège de France: “Química de Materiales Híbridos: Biomimetismo y Bioinspiración”. Le presentó el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega, Académico de Número de la RANF.

14 de abril

Conferencia del Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Académico de Número de la RANF, titulada: “Glicopatología, Glicoterapéutica y marcadores tumorales glicánicos”.

NOTICIAS

El pasado mes de febrero nuestro académico correspondiente electo, el Dr. Antonio Salinas Sánchez, participó en el módulo de odontología en el marco del XII Congreso Internacional de avances en Medicina, celebrado en Guadalajara (México), impartiendo una ponencia titulada: “Materiales utilizados para los procesos de regeneración ósea y dental”. En su intervención hizo referencia al hecho de que los materiales utilizados hoy día para implantes corresponden a investigaciones realizadas hace 20 años. Actualmente se utilizan Biomateriales de tercera generación con objeto de inducir regeneración ósea y dental. También destacó el hecho de que los Biomateriales son funcionales e inteligentes, es decir, con propiedades que responden al entorno donde se utilizan.

* * * *

En el Pleno de la Junta General celebrada el pasado día 3 de marzo en la RANF se le concedió la Medalla de oro Carracido, nuestra máxima condecoración, al Dr. Raúl Guerra Garrido. Nacido en 1935 en Madrid pero de ascendencia leonesa, cursó estudios de Farmacia, obteniendo también el doctorado. En 1960 se estableció en el País Vasco, residiendo desde ese año en la ciudad de San Sebastián, en la que ha ejercido como farmacéutico comunitario. En 1969 publicó la novela Ni héroe ni nada, a la que seguirá en 1970 Cacereño, narración con concomitancias biográficas, que se refiere al tema de la emigración al País Vasco. En 1971, aparece el ensayo divulgativo Medicamentos españoles, editado por Dopesa, sobre el mundo del medicamento y la profesión farmacéutica. En 1976, gana el Premio Nadal, por su novela Lectura insólita del capital, que ha sido reeditada por Destino en el año 2001 con motivo de su 25 aniversario. En el 2001, le fue concedido en Barcelona, en un acto que tuvo lugar en el Gran Teatro del Liceo, el premio farmacéutico del año, promovido por la editorial Mayo. Le hizo entrega del galardón la ministra de Sanidad Celia Villalobos. En el año 2006 le fue concedido el Premio Nacional de las Letras Españolas. También ha sido galardonado con la Medalla al Mérito Constitucional otorgada por el Gobierno de España.

* * * *

El pasado 21 de marzo, a la 19,30 tuvo lugar en la Casa Iberoamericana de Cádiz la entrega de los Premios Cortes de Cádiz. Presidió el acto la Excm. Sra. Doña Teófila Martínez, Alcaldesa de Cádiz, asistiendo en la presidencia Don Enrique V. Iglesias, Secretario General Iberoamericano y Doña Judith Pinedo Alcaldesa de Cartagena de Indias. Recibió el Premio Iberoamericano de Botánica la Dra. María Amélia Martins Loução, tras la laudatio pronunciada por el Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, asistió al acto en representación de la RANF, el Dr. Don Antonio Doadrio Villarejo, Secretario Académico. La obra presentada desde la Facultad de Biología de la Universidad de Lisboa destacaba sobre las restantes. Por otra parte se daba la feliz circunstancia de que la autora era ya bien conocida en la Academia, ya que es uno de los Académicos correspondientes de nuestra Academia en Portugal.

A continuación se recogen las palabras pronunciadas por la Dra. Martins Loução a la recogida del citado premio:

Ilustrísima alcaldesa de Cádiz, Doña Teófila Martínez.

Distinguido Secretario General Iberoamericano, D. Enrique Iglesias.

A todos los presentes y ausentes miembros del jurado de este distinguido premio, contado con la colaboración de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Real Academia Hispano Americana de Cádiz.

Muchas gracias.

Os lo agradezco profundamente. Me siento muy honrosa y honorada de la entrega de este prestigioso premio. Por dos motivos:

Primero por la distinción de ser incluida en las Cortes de Cádiz. El próximo año se va a conmemorar el bicentenario de la constitución de 1812, adonde muchos de los principios fundamentales sobre la libertad siguen hasta nuestros días. Es un privilegio tener mi nombre asociado a tan distintiva conmemoración. Antes como ahora, es importante disfrutar y defender la libertad. La libertad individual, la libertad de prensa, ya el cuarto poder.

Segundo, porque este premio se titula de José Celestino Mutis, ilustre naturalista gaditano, eminente botánico de reconocimiento mundial, padre de la Ciencia de Colombia. Una personalidad científica global, un apóstol de la ciencia fundamental que por su lado defendía la libertad científica y la transmisión del conocimiento. Como académica y científica que soy, esta libertad es crucial para que se promueva el avance de la ciencia, la valoración del bien común, el desarrollo de la economía.

“Mantengo abiertas las puertas en cualquier hora” (Celestino Mutis).

Ante este honor que me habéis concedido también yo, aquí y ahora, puedo decir que estoy a vuestra disposición, para unirme a vuestras actividades con mucho gusto.

Ya conocen mis actividades científicas y académicas, subrayadas en el laude proferido por el Profesor Antonio Ramón Martínez, a quien mucho agradezco.

Me gustaría subrayar el trabajo que me ha traído hasta aquí: el algarrobo. Planta mediterránea, distribuida por todo el Mediterráneo y teniendo en la Península su máxima producción. De su semilla -el garofín- se extrae una goma preciosa para nuestra salud, por la pureza que ofrece y por eso la única que se puede utilizar en la industria alimentaria.

Nada o muy poco se conocía del algarrobo. Ha sido muy difícil para mí elegir este camino: entre una incertidumbre, por la dificultad en trabajar con una planta leñosa, y otra área de más éxito, como la de la microbiología de los organismos fijadores de nitrógeno.

“Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for” (Fernando Pessoa). Aquella época elegí lo desconocido, pero bello y desafiante.

Durante los últimos 30 años he estudiado la planta, el árbol, sus variedades, su capacidad de adaptación al clima mediterráneo y edafología. Mi propuesta ahora, después de este premio, es escribir un libro más actual que pueda servir a todos que lo quieran disfrutar mi trabajo conociendo mejor el cultivo y el modo para aumentar su producción.

“Sin instrumentos ni el continuo desvelo de observaciones no se puede penetrar los movimientos arreglados del verdadero sistema del mundo” (Celestino Mutis).

Significa esto que han sido necesarias muchas experiencias, testigos, recogida de datos a lo largo de años. Muchas desilusiones, pero mucha disciplina.

Con mucha determinación y voluntad he logrado importantes resultados. Pero todo esto fue posible gracias a muchos estudiantes y compañeros, nacionales y extranjeros, a quien quiero aquí dejar mi agradecimiento y testimonio de aprecio. A ellos y a su dedicación debo hoy estar aquí con vosotros.

“Em havendo olhos maus não há obras boas” (Padre António Vieira).

Aquí, quiero agradecer al equipo de los jurados que han visto en mi propuesta el trabajo y lo bueno que he alcanzado. En particular quiero aquí agradecer formalmente a la Real Academia de Farmacia, particularmente en la persona del Profesor Bartolomé Ribas. Por haberme dado a conocer esta oportunidad, por haber acreditado que tenía capacidad ganadora; yo, que soy académica correspondiente extranjera.

En definitiva estoy muy agradecida y honorada de poder recibir esta prestigiosa distinción.

Maria Amélia Martins-Loução

* * * *

El Diario de Burgos acaba de publicar un libro especial con motivo de sus 120 años de andadura. En él se recogen 120 personajes de la vida burgalesa, entre los que se encuentran nuestros queridos compañeros Benito del Castillo junto con Obdulio Fernández y Juan Manuel Reol.

* * * *