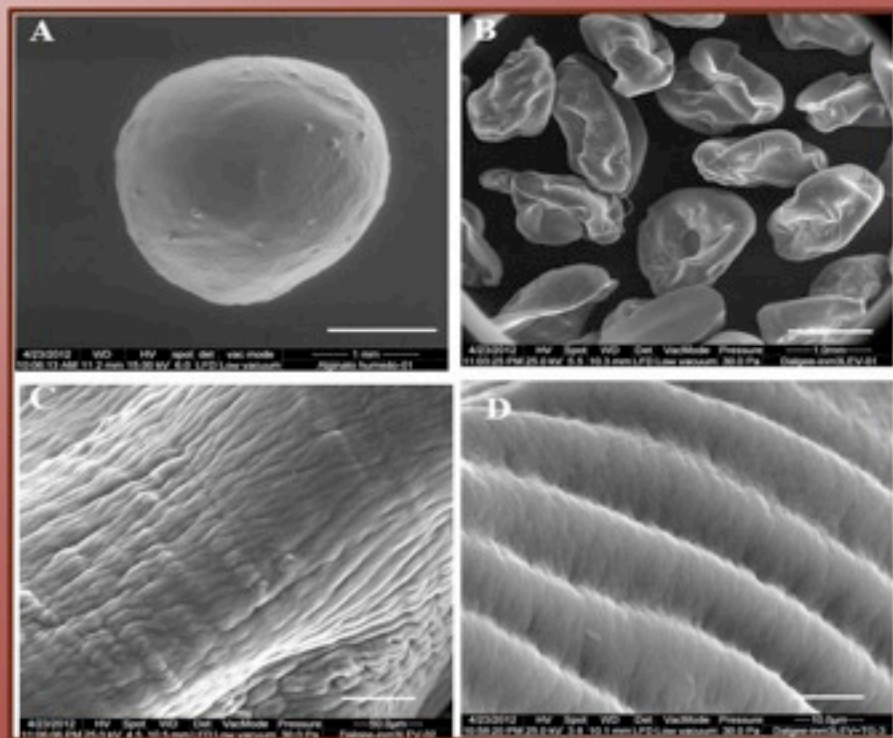


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 81 | Número 1 | Enero-Marzo 2015 | Páginas 1-82



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación
Cultura y Deporte



Teixobactine, a new antibiotic that would hardly produce resistance

Title in Spanish: *Teixobactina, un nuevo antibiótico que difícilmente podría originar resistencias*

Carmen Avendaño¹

¹Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

ABSTRACT: Antibiotic resistance is spreading faster than the introduction of new compounds into clinical practice, causing a public health crisis. In a recent publication has been described a new antibiotic of depsipeptide nature named teixobactin that was discovered in a screen of uncultured soil bacteria (1). This compound inhibits cell wall synthesis by binding to a highly conserved motif of lipid II (precursor of peptidoglycan) and lipid III (precursor of cell wall teichoic acid). The method developed in its discovery and the apparent ability of teixobactin to avoid resistances, may open a path towards the development of other clinically useful antibiotics.

RESUMEN: La resistencia a los antibióticos se ha desarrollado más eficazmente que la introducción de nuevas estructuras, lo que ha provocado un importante problema de salud pública. En una reciente publicación se ha descrito el hallazgo de un nuevo antibiótico denominado teixobactina por cribado de bacterias del suelo no cultivadas hasta el momento (1). Este compuesto es un depsipéptido que inhibe la síntesis de la pared celular enlazándose a un motivo muy conservado del lípido II (precursor de péptidoglicano) y al lípido III (precursor del ácido teicoico). Tanto el método desarrollado en su descubrimiento como la aparente capacidad de teixobactina para evitar resistencias, podrían dar lugar a otros antibióticos clínicamente útiles.

*Corresponding Author: avendano@farm.ucm.es An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 1 (2015), pp. 4-10

Received: February 26, 2015 Accepted: Mars 3, 2015

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde que en los años 1940 se introdujo la penicilina en la práctica clínica, los antibióticos han salvado la vida de millones de seres humanos, pero en los últimos tiempos el arsenal contra los microorganismos patógenos se ha estancado. La dificultad de encontrar antibióticos que penetren la pared bacteriana y la falta de interés de la industria farmacéutica debida a la impredecible aparición de resistencias, son algunos de los motivos que pueden justificar este estancamiento. Otro es que los microbiólogos no han detectado nuevos antibióticos naturales debido a que el número de especies que se pueden cultivar en laboratorio representa un pequeño porcentaje de todas las que se pueden encontrar en el suelo, el caladero en que habitualmente se han encontrado aquéllos, y que los antibióticos sintéticos no han sido capaces de sustituir a los naturales (2). La mayoría de los antibióticos utilizados en terapéutica son productos naturales que proceden de diferentes especies de hongos y bacterias, especialmente del grupo de los actinomicetos, que en su mayoría se encuentran en la tierra, y se han aislado por cribado de estos microorganismos una vez cultivados.

2. BREVE COMENTARIO SOBRE LAS RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

El problema de las resistencias a los antibióticos es antiguo. Ya en 1955, el 13% de las infecciones por *Staphylococcus aureus* eran insensibles al tratamiento con penicilina, una cifra que ascendió hasta el 91% en 1988. Esta bacteria es la causante de la mayoría de las infecciones debidas a estafilococos, pudiendo originar neumonía, meningitis, shock tóxico, infecciones de las válvulas cardiacas, conjuntivitis, abscesos cutáneos, etc. Muchas cepas de *S. aureus* son ahora resistentes también a otros antibióticos como oxacilina y amoxicilina, y han comenzado a desarrollar resistencias a metilicina (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) y vancomicina, antibióticos que en otros tiempos se consideraban como “último recurso” para las infecciones más serias. En EEUU se ha estimado que casi 2 millones de personas adquieren cada año alguna infección hospitalaria, y que un 70% de estas infecciones son insensibles al menos a uno de los antibióticos utilizados habitualmente. Un estudio bastante reciente ha señalado que en 2011 murieron durante su hospitalización más 11000 personas con infecciones MRSA (3).

El creciente problema de la aparición de bacterias resistentes a antibióticos ha comprometido su eficacia. Sin embargo, en 1967 se pensaba que los antibióticos, junto a

otros agentes quimioterápicos, podían eliminar cualquier microorganismo patógeno y se declaró oficialmente que el problema de las infecciones había terminado. Esta visión optimista menospreció la increíble capacidad que tienen las bacterias para intercambiar su material genético y adaptarse a situaciones adversas por selección natural, y que las mutaciones que originan resistencias a los antibióticos pueden transferirse a las sucesivas generaciones en los procesos de reproducción bacteriana (4).

Además de su importancia clínica, los antibióticos son uno de los grupos farmacológicos más utilizados en la terapéutica, profilaxis y promoción del crecimiento de animales destinados al consumo humano, lo que ha contribuido a la selección de poblaciones microbianas resistentes. La European Federation of Animal Health Industries (FEDESA) estimó en 1997 que en la UE se consumían anualmente unas 10500 toneladas de antibióticos, de las que el 52% eran para uso humano (ambulatorio y hospitalario), un 33% se destinaba al uso terapéutico en animales, y un 15% eran aditivos de piensos utilizados como promotores del crecimiento (5). Como los antibióticos se eliminan en general antes de que sean metabolizados, se excretan al medio ambiente en cantidades masivas y continúan actuando sobre las bacterias presentes en las aguas fecales, cuyas cepas resistentes pueden pasar a frutas y vegetales y después al hombre y animales. Estas son las razones por las que la Unión Europea ha prohibido el uso de los antibióticos para fomentar el crecimiento de los animales (6), y la FDA y la EMA vienen produciendo periódicamente diversos documentos dirigidos al uso juicioso de los mismos para minimizar la aparición de microorganismos resistentes. Dentro de un ciclo de 5 conferencias organizado por el Instituto de España que dicté del 9 al 13 de diciembre de 2002, me referí en dos de ellas a este problema (7).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en un informe presentado en abril del año pasado, advertía de que el problema de la resistencia microbiana es tan grave que pone en peligro los logros de la medicina moderna. Cada vez se producen más infecciones causadas por gérmenes que se han hecho resistentes a los tratamientos habituales, y hoy sabemos que el desarrollo de resistencias para cada nuevo antibacteriano que se introduce en el mercado es sólo cuestión de tiempo. La selección de bacterias resistentes se traduce en un fracaso terapéutico tanto en personas como en animales, y los problemas sanitarios que origina son a veces irreparables. No menos importantes son los cambios que producen los antibióticos no absorbibles y los de amplio espectro administrados oralmente en la flora intestinal. Se considera que en la flora intestinal de la especie humana hay más de 200 especies diferentes de bacterias en un difícil equilibrio, y

su modificación puede provocar graves consecuencias de carácter patológico debido a que muchas de estas especies participan en el metabolismo y la producción de distintas sustancias, afectando a la morfología de la mucosa intestinal y al sistema linfático asociado y constituyendo una defensa contra la implantación de bacterias exógenas que se denomina “efecto barrera”.

Las bacterias resistentes a antibióticos causan buena parte de las 4,1 millones de infecciones hospitalarias que se registran en Europa cada año y alargan las estancias hospitalarias, pudiendo llegar a ocasionar la muerte de hasta la mitad de los infectados en los casos más virulentos (se estima que originan unas 25000 muertes al año y generan unos costes sanitarios de 1500 millones de euros). Las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos de último recurso están creciendo también en España, según un informe elaborado en 2013 por el Centro Europeo de Control de las Enfermedades (ECDC) tras recabar información en 39 países europeos. Actualmente, la Unión Europea está financiando un proyecto de búsqueda de antibióticos más efectivos con técnicas que combinan la química, la biología y la computación.

3. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y VANCOMICINA. MECANISMOS RESPONSABLES DE SU ACCIÓN Y DE LA APARICIÓN DE RESISTENCIAS

Dentro de los antibióticos de origen natural destacan dos importantes mecanismos de acción: la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y la inhibición de la síntesis de proteínas (8). Comentaremos brevemente el primero de estos mecanismos. El péptidoglicano es un componente esencial de la pared bacteriana que determina su rigidez y resistencia frente a las diferencias de presión osmótica. Se trata de un polisacárido en el que se alternan unidos mediante enlaces β -1,4 monómeros de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, este último enlazado a una cadena pentapeptídica. Este disacárido-péptido se une posteriormente a un transportador lipídico y se trasloca dentro del periplasma bacteriano para que varias enzimas completen su polimerización y se realice la transpeptidación catalizada por enzimas denominadas transpeptidasas. En esta reacción se origina un enlace cruzado entre el resto D-Ala penúltimo del pentapéptido y un aminoácido básico de otra cadena (L-Lys en la Figura 1) con eliminación del residuo D-Ala terminal. Esta malla porosa permite el paso de nutrientes desde el exterior y de enzimas catalíticas y productos de secreción hacia el exterior celular. Muchos antibióticos naturales tienen como diana enzimas o sustratos implicados en su biosíntesis.

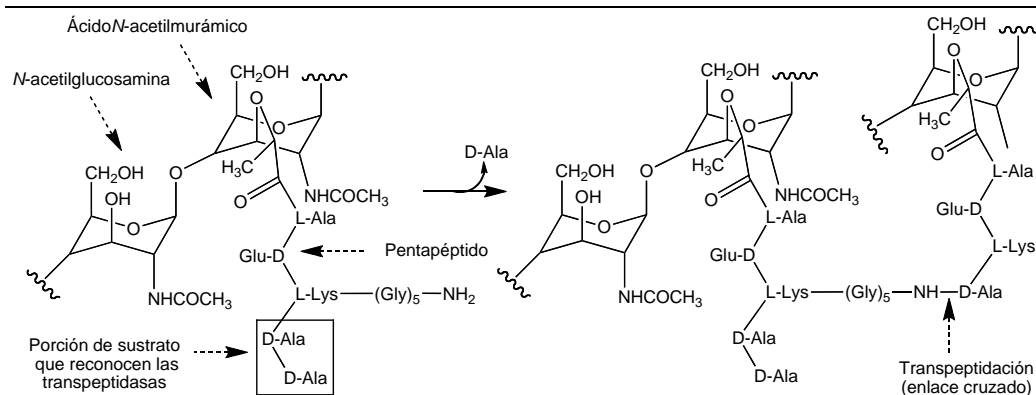


Figura 1. Etapas finales en la biosíntesis del péptidoglicano.

Entre los inhibidores de este proceso biosintético, los más representativos son los antibióticos β -lactámicos y la vancomicina. Los primeros actúan inhibiendo las transpeptidasas, y constituyen un conjunto de productos naturales, semisintéticos o totalmente sintéticos en el que se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas. Durante décadas se ha tratado de mejorar su espectro de acción y contrarrestar las resistencias, sobre todo en patógenos Gram positivos como los estafilococos meticilina-resistentes, enterococos ampicilina-resistentes y pneumococos penicilina-resistentes. El ciclo de β -lactama, por su semejanza con los residuos D-Ala-D-Ala, actúa como falso sustrato de las transpeptidasas (también llamadas “penicillin binding proteins” o PBPs), y su apertura por ataque nucleófilo de un residuo de serina situado en el sitio activo de éstas origina su inactivación debido a que los derivados de tipo éster así formados se hidrolizan muy lentamente (ver el mecanismo de este proceso para las penicilinas en la Figura 2). Las bacterias se protegen de estos fármacos expresando β -lactamasas, unas peptidasas similares a las PBPs que, una vez aciladas, se hidrolizan rápidamente, lo que conduce a que el antibiótico se inactive (9). Esta semejanza explica que sea difícil diseñar antibióticos β -lactámicos poco sensibles a β -lactamasas que se enlacen eficazmente a PBPs. Ciertos microorganismos, como *Streptococcus pneumoniae*, no biosintetizan β -lactamasas, pero se hacen resistentes modificando sus PBPs por mutaciones en varios aminoácidos, lo que les confiere menor afinidad por casi todas las β -lactamas. *S. aureus* se hace resistente a meticilina codificando un tipo de PBP de gran peso molecular (PBP2') con poca afinidad por este antibiótico.

La vancomicina, descubierta en 1955, es un glicopéptido soluble producido por una cepa de *Amycolatopsis orientalis* (*Nocardia orientalis*) que desarrolló la empresa Lilly como alternativa terapéutica a la rápida difusión de resistencias a los antibióticos β -lactámicos, como ocurre en cepas de *S. Aureus* resistentes a meticilina (SARM) y en *E. faecalis* (que produce con frecuencia infecciones en pacientes tratados con diálisis o con quimioterapia). Vancomicina se enlaza mediante cinco enlaces de hidrógeno al extremo D-Ala-D-Ala de la cadena

polipeptídica anteriormente mencionada, impidiendo que ésta sea reconocida por las transpeptidasas (Figura 3) (10).

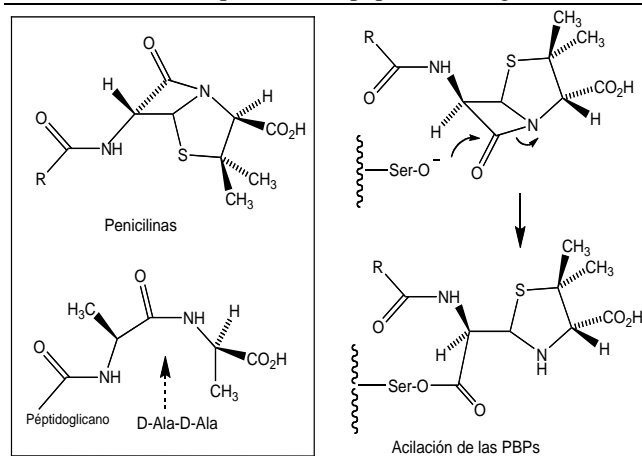


Figura 2. Inactivación de transpeptidasas de péptidoglicano por penicilinas.

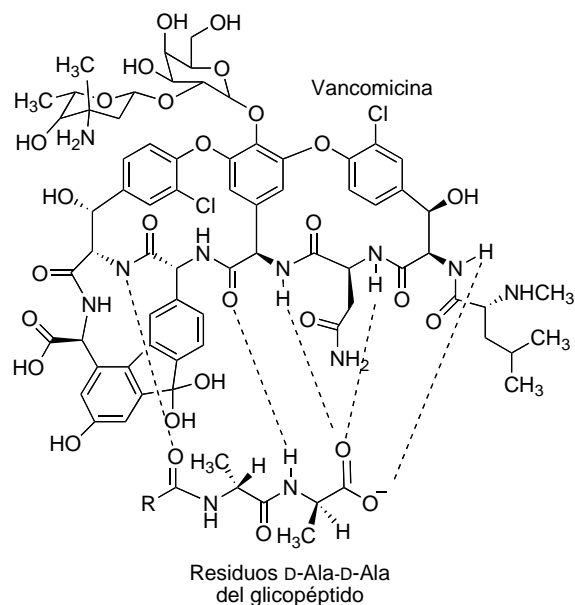


Figura 3. Interacción de vancomicina con la cadena D-Ala-D-Ala del precursor de péptidoglicano que reconocen las transpeptidasas.

La aparición en los años 80 de infecciones severas originadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos Gram positivos, convirtieron a la vancomicina en el antibiótico de primera elección para su tratamiento, pero en 1986 se aislaron las primeras cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (VRE)⁽¹¹⁾ y desde entonces la incidencia de VRE se está extendiendo en el medio hospitalario, sobre todo en casos de inmunodeficiencia por SIDA, quimioterapia y estados postoperatorios.

Las bacterias se hacen resistentes a vancomicina reemplazando la porción D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-lactato, de forma que el antibiótico sólo puede enlazarse con 4 enlaces de hidrógeno (no existe el grupo NH del residuo D-Ala terminal). Esta mutación se realiza por activación de los genes que codifican una α -ceto-reductasa que convierte el piruvato en D-lactato, así como de una ligasa dependiente de ATP que cataliza la unión de D-lactato a D-alanina. El complejo formado entre la vancomicina y la porción D-Ala-D-lactato es unas 3 veces más débil que el formado con D-Ala-D-Ala, y al romperse fácilmente se pierde la actividad antibacteriana. La resistencia a vancomicina también puede producirse por sobreexpresión de una D-Ala-D-Ala dipeptidasa dependiente de Zn^{2+} que hidroliza selectivamente este dipéptido, permitiendo que se acumule D-Ala-D-lactato y se incorpore al péptidoglicano.

La oxazolidinona linezolidina (Zyvox[®]) es un antibiótico sintético inhibidor de la síntesis proteica que se comercializó en el año 2000 para tratar VRE (12).

4. DESCUBRIMIENTO DEL NUEVO ANTIBIÓTICO TEIXOBACTINA

Se estima que alrededor del 99% de las especies bacterianas que habitan fuera de los seres vivos son una fuente de antibióticos que no se ha explotado todavía porque estas bacterias no han podido cultivarse, y esta idea ha incentivado el desarrollo de métodos para conseguirlo. Con este objetivo, la compañía biotecnológica estadounidense NovoBiotic Pharmaceuticals, desarrolló unas membranas semipermeables para construir cámaras de difusión que restringen el movimiento de las células pero permiten por difusión el libre intercambio con el medio externo de compuestos (13) así como la inclusión de factores de crecimiento naturales, por ejemplo los sideróforos quelantes de hierro, un metal necesario para muchos procesos biológicos de tipo oxidativo (14). Si los cultivos se realizaban en una placa Petri se obtenía un 1% de las células que contiene una muestra de suelo, mientras que el uso de estas membranas semipermeables permite obtener aproximadamente un 50% (15). Tras desarrollar un *chip* de aislamiento que dispone de varios cientos de cámaras de difusión en miniatura para inocular en cada una de ellas una única célula (*isolation chip*, *ichip*) (16), un equipo de investigadores de las universidades de Northeastern y Harvard en Boston encontró el antibiótico

peptídico lasomicina, que tiene como diana a la proteasa ClpC1P2 dependiente de ATP y posee actividad bactericida frente a todas las formas de *M. tuberculosis*, incluidas las resistentes (17).

En esta publicación que comentamos, se han unido dos grupos de las universidades de Northeastern y de Bonn para analizar la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* de unas 10000 cepas de bacterias procedentes de muestras de suelos, observando que el extracto de una nueva proteobacteria denominada de forma provisional *Eleftheria térrae*, mostraba una buena actividad. La secuenciación de su genoma permitió clasificarla dentro de un nuevo género relacionado con las *Aquabacteria*, un grupo de microorganismos Gram-negativos de los que hasta el momento no se conocía su capacidad para producir antibióticos. En una fracción parcialmente purificada de sus cultivos se encontró un compuesto con una masa de 1242 Da que no aparecía en las bases de datos disponibles. Una vez aislado, se determinó su estructura y estereoquímica y se denominó teixobactina. Es un depsipéptido (con estructura mixta de péptido y éster) que contiene cuatro D-aminoácidos, *N*-metilfenilalanina, y el aminoácido enduracidina (Figura 4) (18).

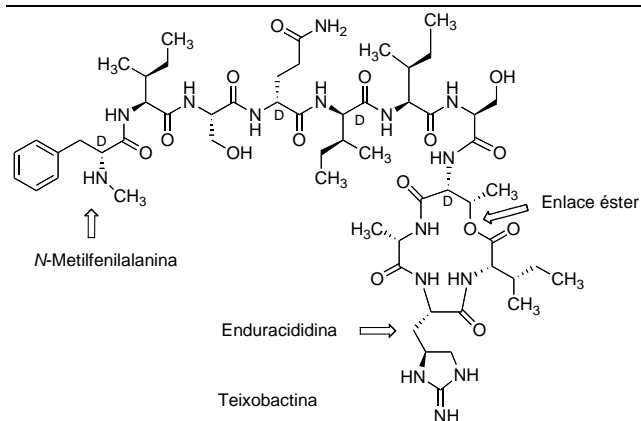


Figura 4. Estructura de teixobactina.

5. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE TEIXIBACTINA

Las bacterias Gram negativas, por tener una doble membrana, son impermeables a grandes moléculas y son más difíciles de atacar que las Gram positivas. La teixobactina mostró una excelente actividad frente a varios microorganismos patógenos Gram-positivos, incluidas sus cepas resistentes, y sus dianas son precursores de péptidoglicano y de ácidos teicoicos de la pared celular, fácilmente accesibles para el antibiótico.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de teixobactina frente a la mayoría de las especies ensayadas, incluyendo enterococos y *M. tuberculosis*, fue menor de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, siendo excepcionalmente activa frente a *Clostridium difficile* (causante de diarreas), y *Bacillus anthracis* (que provoca el ántrax), con MIC de 5 y 20 ng ml^{-1} , respectivamente. Su actividad frente a *S. aureus* fue superior a la de vancomicina, manteniendo la actividad

bactericida frente cepas de resistencia intermedia. Aunque no fue activa frente a bacterias Gram negativas, sí lo fue frente a la cepa *asmB1* de *E. coli*, que carece de la membrana más externa, y no fue tóxica para las células de mamífero NJH/3T3 y HepG2 a 100 µg ml⁻¹, que fue la mayor dosis ensayada. Por otra parte, tras su uso repetido, no se hallaron mutantes de *S. aureus* o *M. tuberculosis*.

6. MECANISMO DE ACCIÓN DE TEIXOBACTINA

Pronto se observó que la teixobactina inhibe algún paso en la síntesis de péptidoglicano sin afectar a la síntesis de ADN, ARN o proteínas y, de forma similar a la vancomicina, el tratamiento de *S. aureus* con teixobactina a dosis entre una a cinco veces superiores a la MIC produjo la acumulación de undecaprenil-*N*-acetilmurámico pentapéptido. Otros experimentos pusieron de manifiesto que teixobactina no actúa como inhibidor enzimático, sino que interacciona con el grupo pirofosfato y el primer resto de azúcar presentes en precursores poliprenilados de la pared bacteriana. De hecho, originó complejos estables con los lípidos I y II (Figura 5) que pudieron analizarse.

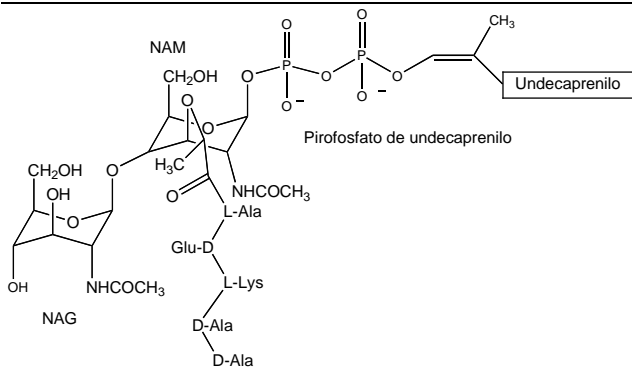
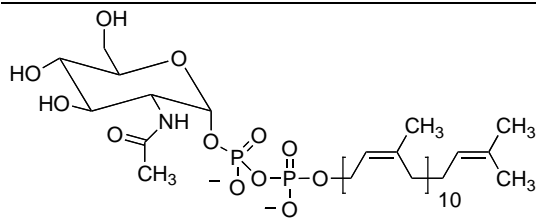


Figura 5. Estructura del lípido II.

También se enlazó eficazmente a undecaprenilpirofosfato de *N*-acetilglucosamina (lípido III, Figura 6), que es precursor del ácido teicoico de la pared.



Undecaprenilpirofosfato de *N*-acetilglucosamina

Figura 6. Estructura del lípido III.

Los ácidos teicoicos son grandes polímeros de tipo fosfodiéster formados por ribitol y glicerol fundamentalmente, enlazados covalentemente a través de un grupo fosfato al péptidoglicano (Figuras 7 y 8).

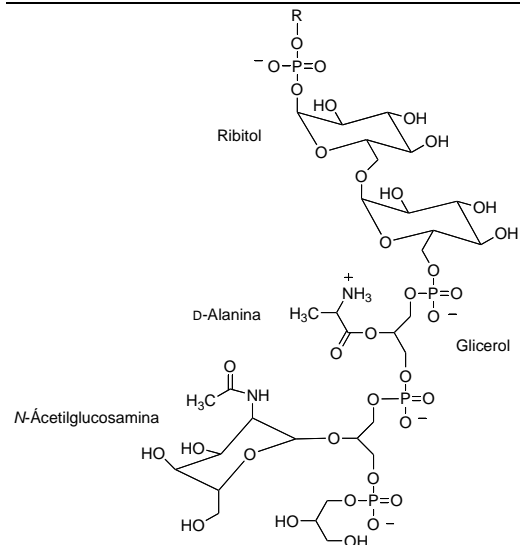


Figura 7. Estructura representativa de un ácido teicoico.

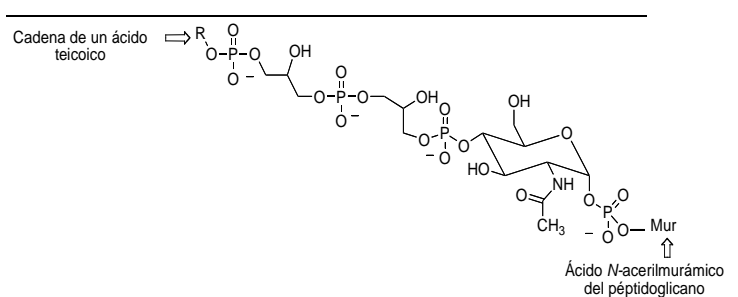


Figura 8. Estructura representativa de un ácido teicoico enlazado a péptidoglicano.

Aunque el ácido teicoico de la pared no es esencial *per se* para la vida de las bacterias (19), la inhibición de los últimos pasos de su biosíntesis es letal porque produce la acumulación de compuestos tóxicos. Además, dado que los ácido teicoicos se enlazan a autolisinas evitando así la hidrólisis incontrolada del péptidoglicano (20), la inhibición de su biosíntesis provocada por teixobactina puede ayudar a liberar autolisinas y contribuir a la lisis bacteriana. Teixobactina podría enlazarse también a intermedios de la biosíntesis de polisacáridos de la cápsula bacteriana de tipo prenil-PP-azúcar, que son importantes para la virulencia de estafilococos y estreptococos (21).

7. ACTIVIDAD *IN VIVO* Y EXPECTATIVAS

Los estudios *in vivo* se realizaron en un modelo de ratón con septicemia originada por *S. aureus* resistente a meticilina. Los valores PD50 (dosis protectora a la que sobreviven la mitad de los animales) fue de 0,2 mg/Kg, un valor menor que el de vancomicina (2,75 mg/Kg) que, como ya se ha dicho, es el principal antibiótico utilizado para el tratamiento de bacterias MRSA. La teixobactina fue también eficaz en ratones infectados con *Streptococcus pneumoniae*.

El desarrollo de resistencias frente a teixobactina

parece en principio poco probable porque su mecanismo de acción en la pared bacteriana es semejante al de vancomicina, y las bacterias tardaron unos treinta años en desarrollar resistencia frente a ella. El periodo de tiempo antes de la aparición de resistencias podría ser aún mayor en la teixobactina, ya que sus dianas son más variadas.

A pesar de la euforia que ha producido esta noticia y su gran repercusión mediática (22), hay que tener en cuenta que el desarrollo de teixobactina requiere muchos más estudios y ensayos clínicos para evaluar su toxicidad y eficacia en humanos, lo que requerirá en el mejor de los casos que transcurran unos cinco años. Además, como ya se ha mencionado, tiene la limitación de muchos otros antibióticos: no ser activo frente a bacterias Gram negativas.

8. REFERENCIAS

1. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen Ch, Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 2015; 517: 455-459.
2. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Rev Drug Discov* 2007; 6: 29-40.
3. Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, Lessa FC, Lynfield R, Nadle J, Petit S, Ray SM, Schaffner W, Townes J, Fridkin S. National Burden of Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections United States 2011. *JAMA Intern Med* 2013; 173: 1970-1978.
4. See for instance: Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswy S, Bidet Ph, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier Ch, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, El Karoui M, Frapy E, Garry L, Ghigo J M, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguéneq Ch, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit M A, Pichon Ch, Rouy Z, Saint Ruf C, Schneider D, Turret J, Vacherie B, Vallenet D, Médigue G, Rocha EPC, Denamur E. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000344.
5. Follet G. Antibiotic resistance in the EU-Science politics and policy. *AgBioForum* 2000; 3: 148-155.
6. Gilbert N. Rules tighten on use of antibiotics on farms. *Nature* 2012; 481: 125.
7. Avendaño C. El poder de la química: cómo se transforma la información a nivel molecular en fármacos innovadores. Madrid: Instituto de España 2003.
8. Peláez F, Genilloud O. Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano. In: Nuevos avances en medicamentos. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 2004; pp. 123-166.
9. Spratt BG. In: Ghuyen JM, Hakeubeck R, Eds. *Bacterial Cell Wall*. Elsevier 1994; pp. 517-534.
10. Hubbard BK, Walsh ChT. Vancomycin Assembly: Nature's Way *Angew. Chem Int Ed* 2003; 7: 706-712.
11. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; 1: 57-58.
12. Chien JW, Kucia ML, Salata RA. Use of linezolid an oxazolidinone in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 146-151.
13. Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of Environmental Samples in a Diffusion Chamber Increases the Diversity of Recovered Isolates. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6386-6390.
14. Xiao R, Kisaalite WS. Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *P. aeruginosa* ploverdin. *Microbiology* 1997; 143: 2509-2515.
15. Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaeberlein T, Epstein SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in Vitro. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4889-4897.
16. Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS. Use of icip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2445-2450.
17. Gavrish E, Sit CS Cao S, Kandror O, Spoering A, Peoples A, Ling L, Fetterman A, Hughes D, Bissell A, Torrey H, Acopian T, Mueller A, Epstein S, Goldberg A, Clardy J, Lewis K. Lassomycin a ribosomally synthesized cyclic peptide kills mycobacterium tuberculosis by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chem Biol* 2014; 21: 509-518.
18. a) Bhushan R, Brückner H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* 2004; 27: 231-247. b) Bhushan R, Brückner H. Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: Assessment and applications to natural products and biological systems. *J Chromatog* 2011; 29: 3148-3161.
19. D'Elia MA, Pereira MP, Chung YS, Zhao W, Chau A, Kenney TJ, Sulavik MC, Black TA, Brown ED. Lesions in teichoic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus* lead to a lethal gain of function in the otherwise dispensable pathway. *J Bacteriol* 2006; 188: 4183-4189.
20. Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* 1985; 141: 249-254.
21. a) O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 218-234. b) Xayarath B, Yother J. Mutations

blocking side chain assembly polymerization or transport of a Wzy-dependent *Streptococcus pneumoniae* capsule are lethal in the absence of suppressor mutations and can affect polymer transfer to the cell wall. *J Bacteriol* 2007; 189: 3369-3381.

22. Ver por ejemplo: a) First new antibiotic in 30 years discovered in major breakthrough. *The Telegraph*. 2015 Enero 7. b) El primero de una nueva clase de antibióticos. *ABCsalud*. 2015 Enero 7. c) Gallagher J. Antibiotics: US discovery labelled 'game-changer' for medicine. *BBC News website*. 2015 Enero 7. d) Grady D. New Antibiotic Stirs Hope Against Resistant Bacteria. *The New York Times*. 2015 Enero 7.



New concepts on the functionality of the nervous system: the revolution of the glial cells. I. The neuro-glial relationships

Title in Spanish: *Nuevos conceptos sobre la funcionalidad del sistema nervioso: la revolución de las células gliales. I. Las relaciones neuro-gliales*

Adolfo Toledano^{1,2}, María-Isabel Álvarez¹, Adolfo Toledano-Díaz³

¹Instituto Cajal, CSIC Madrid. ²Académico correspondiente RANF. ³Departamento Reproducción, INIA, Madrid Madrid, Spain

ABSTRACT: From birth to death, neurons are actively and dynamically accompanied by neuroglial cells in a very close morphological and functional relationship. The results of their study in the last years revolutionized the concepts about the functionality of the CNS. Classically, three families of these cells in the CNS have been classically considered: astroglia, oligodendroglia and microglia. Many types and subtypes have been described by morphological and immunocytochemical methods, including NGR2+ cells, with a wide variety of pathophysiological effects on the neurons and neuronal circuits. Now, all these elements are considered of paramount importance in all proposed theories for explaining any physiological or pathological process in the CNS because they are involved in both, neuroprotection/neurorepair and neurodegeneration. Glio-glial, glio-neuronal and neuro-glial cell signaling pathways and glio-transmission are essential phenomena that support the brain functions, from a simple reflex to the most sophisticated higher mental function. Glioplasticity is a parallel phenomenon to neuroplasticity for optimizing the function of the neuronal circuits. Moreover, they possess the ability to change to a reactive status (gliosis), in which new functions are developed in their relationships with the neurons.

RESUMEN: Durante toda su vida, las neuronas están acompañadas por células neurogliales con las que establecen relaciones muy estrechas, tanto morfológicas como funcionales. Los resultados de su estudio en los últimos años han revolucionado los conceptos sobre la funcionalidad del SNC. Clásicamente se describen tres familias de células neurogliales en el SNC, astroglia, oligodendroglia y microglia. Mediante métodos morfológicos e inmunocitoquímicos se han descrito muchos tipos dentro de cada familia, incluyendo algunos de características novedosas, como las células NGR2+, con una gran variedad de efectos fisiológicos y patológicos sobre las neuronas y los circuitos neuronales. En la actualidad, estos elementos se consideran de primordial importancia en todas las teorías desarrolladas para explicar cualquier tipo de proceso fisiológico o patológico en el SNC ya que están implicadas tanto en la neuroprotección/neuroreparación como en la neurodegeneración. La comunicación celular glio-neuronal, neuro-glial y glio-glial, así como la gliotransmisión, son esenciales para llevar a cabo las funciones nerviosas, desde un sencillo reflejo a la función cognoscitiva más sofisticada. La glioplasticidad es un fenómeno que ocurre en paralelo a la neuroplasticidad mediante el cual se optimizan las funciones de los circuitos neuronales. Además, las células gliales tienen la capacidad de activarse pasando a un nuevo estado en el aparecen nuevas funciones (gliosis).

*Corresponding Author: atoledano@cajal.csic.es

Received: January 28, 2015 Accepted: February 24, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 1 (2015), pp. 11-18

Language of Manuscript: Spanish

1. LA REVOLUCIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES

Los resultados de los estudios llevados a cabo en los últimos años sobre las células gliales han revolucionado los conceptos sobre la funcionalidad del SNC (1). Dos han sido los aspectos que más han atraído la atención, la total implicación de las células gliales en todos los procesos del Sistema Nervioso (SN) que hasta ahora se creían de exclusiva competencia de las neuronas (cuyo ejemplo más relevante es la neurotransmisión) (2-14) y su grande y complejo protagonismo en las patologías más específicas del SN (especialmente las neurodegenerativas) (15-23).

Se puede decir que uno de los aspectos más sobresaliente y llamativo de estas células es que ya participan, con pleno derecho y en lugar prominente, en el enunciado de todas las teorías que se han propuesto para explicar cualquier aspecto o faceta, fisiológico o patológico, de la función del SNC. Sabíamos, desde el principio (no olvidemos que Cajal llega a definir la “teoría neuronal” partiendo del estudio de animales en desarrollo), que estas células están presentes en el desarrollo embrionario y la modelación de la citoarquitectura de cada región del SNC. Luego fuimos aprendiendo que no

sólo la astrogliá y la oligodendroglía era un soporte mecánico y protector sino que también eran cooperadores metabólicos y mantenedores de la homeostasis del SN, que es fundamental para el correcto funcionamiento del componente neuronal. En los últimos años se ido comprobando como las células gliales se comunican con las neuronas, y éstas con las células gliales, para regularse mutuamente en sus funciones y hacer que las respuestas globales de los circuitos neuronales sean las más adecuadas (Figura 1). Así, se ha ampliado la participación de cada una de las familias gliales (astroglía, oligodendroglía y microglía) a prácticamente todas las funciones neuronales, de forma que, actualmente, hay que considerar que en todos los procesos neuronales, tanto sencillos como complejos, desde un reflejo monosináptico hasta la más sofisticada de las funciones superiores cognoscitivas, están operando diversas células gliales.

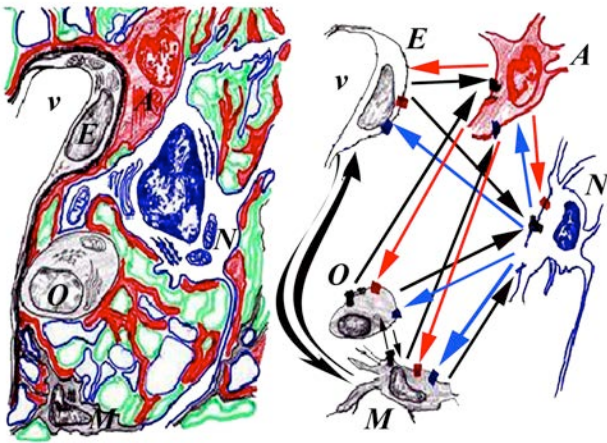


Figura 1. Elementos celulares en el SN y sus relaciones. En la parte derecha, se ha esquematizado la imagen que se observa del SN a nivel de la microscopía electrónica: neuronas (N, en azul), astrocitos (A, en rojo), oligodendrocitos (U, en negro) y células de microglía (M, en negro). Las prolongaciones de estas células forman el neuropilo, donde establecen sinapsis axones con dendritas de diferentes neuronas. En las sinapsis se produce la comunicación celular entre las neuronas, la neurotransmisión, que es la que caracteriza al SN y la base de su funcionalidad. Las prolongaciones de las células gliales envuelven los somas y las prolongaciones neuronales. En la parte izquierda del esquema se han representado las diferentes células (neuronas, células neurogliales y células endoteliales -E) para señalar que, aparte de la neurotransmisión, existen multitud de procesos de comunicación celular entre todas estas células para que funcionen de una manera coordinada y produzcan las respuestas globales óptimas del SN ante cualquier cambio fisiológico o patológico. Los elementos clave en este proceso son mensajeros (inter)celulares (quimioquinas, citoquinas y otros péptidos; NO, eicosanoides, prostaglandinas, radicales libres, etc) y sus respectivos receptores.

Hasta hace pocos años, la neurotransmisión a nivel de las sinapsis, es decir, el fenómeno característico de comunicación entre las neuronas, era la base sobre la que se asentaba el funcionamiento del SN, y se consideraba que las células gliales no intervenían de manera directa aunque sí cooperaban en muchos procesos neuronales

relacionados. Sin embargo, en la actualidad, no sólo se reconoce que existe una directa implicación de la glía para caracterizar la forma y manera en la que se produce la neurotransmisión entre neuronas, sino que, incluso, ciertas células gliales producen y liberan verdaderos transmisores (“gliotransmisores”) operativos en sinapsis “glio-neuronales” y “glio-gliales” similares a las neuro-neuronales clásicas (Figuras 2 y 3). Se han identificado gliotransmisores excitadores (glutamato, ATP, serina, eicosanoides y proteínas) y también gliotransmisores inhibidores (péptidos y adenosina) (1,8,9,14,22-24). Aunque todavía queda mucho por investigar, y algunos autores ponen en duda estos cambios trascendentes para comprender la funcionalidad del SN (25), ya se comienza a substituir el concepto de “redes neuronales” como base de las funciones cerebrales por el de “redes neuro-gliales” (26,27).

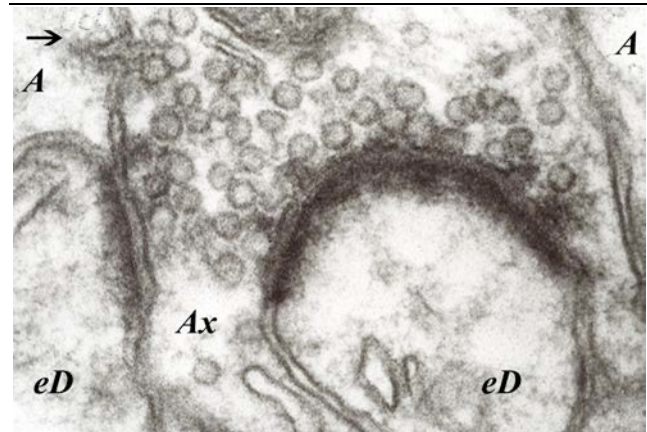


Figura 2. Imagen de sinapsis y gliotransmisión. Cerebelo de rata. Capa molecular. Terminal de fibra paralela (Ax) que hace sinapsis sobre dos espinas dendríticas de célula de Purkinje (eD). Se aprecian las estructuras características (vesículas sinápticas del axón, membranas pre- y post-sinápticas y “cepillo” postsináptico). El conjunto sináptico está envuelto por láminas astrocitarias (A) que también presentan algunas estructuras vesiculares similares a las vesículas sinápticas del axón terminal (Ax) e imágenes de exocitosis (→), todo ello sugerente de “gliotransmisión” sobre las dendritas y/o axón. X50.000

La interrelación entre mecanismos y procesos neuronales y gliales es tan estrecha que los procesos plásticos y adaptativos que acaecen en las neuronas para optimizar sus respuestas fisiológicas o hacer frente a cambios patológicos, automáticamente tienen un correlato de cambios plásticos y adaptativos en las células gliales. Así pues, estas células tienen una elevada capacidad de modificarse, morfológica y funcionalmente, (“glioplasticidad” o “plasticidad glial” - “glial plasticity” o “glioplasticity”) al igual que las neuronas (neuroplasticidad” - “neuroplasticity”) (3-16). Muchas veces es difícil precisar quién es el inductor de los cambios plásticos neuro-gliales para el cumplimiento de una función del SN. Astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales modelan neuronas, sinapsis y circuitos de manera directa; pero también el componente neuronal modifica las propiedades y funciones de las células gliales.

Y esto ocurre también en la involución del SNC (tanto en la senilidad fisiológica como en la patológica/enfermedad de Alzheimer y en todas las situaciones patológicas de cualquier etiología (trauma, enfermedades tóxicas e infecciosas, enfermedades neurodegenerativas no Alzheimer, etc).

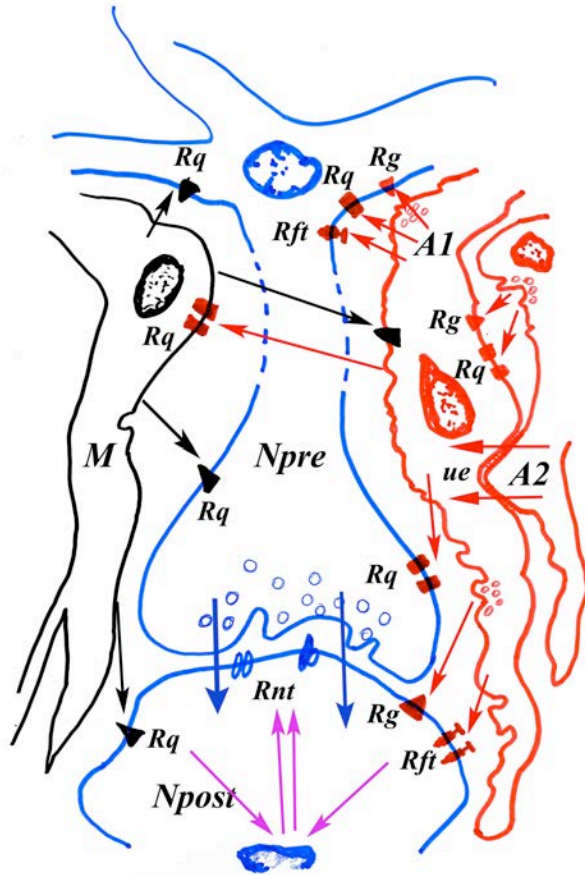


Figura 3. Esquema sobre la integración de diversos sistemas de comunicación celular glio-neuronal y la gliotransmisión en la neurotransmisión. Dos neuronas, una presináptica (Npre) y otra postsináptica (Npost) establecen una comunicación neurotransmisora sináptica mediada por neurotransmisores (flechas azules) liberadas por vesículas sinápticas en la mayoría de los casos y que actúan sobre receptores específicos de la membrana postsináptica (Rnt). La sinapsis está envuelta por prolongaciones gliales de astrocitos (A) y células de microglia (M) que liberan mensajes de comunicación celular que producen cambios en la neurona presináptica (en el soma o sobre el propio botón sináptico) y en la postsináptica, tras activar receptores específicos (Rq). Estos receptores producen cambios en estas neuronas al activar las vías intracelulares de segundos mensajeros (o vías de señalamiento celular) de modo que la respuesta neurotransmisora sináptica queda modulada por cambios citoquímicos a nivel sináptico. Actualmente, se ha puesto de manifiesto que también las células gliales, especialmente los astrocitos, son capaces de producir “gliotransmisores” que tras ser liberados activan zonas neuronales sinápticas con receptores específicos (Rq) produciendo activación o inhibición de las membranas neuronales. Por los canales de las uniones estrechas de los astrocitos (ue; “gap junctions”) también pasan moléculas entre los astrocitos que llegan a liberarse cerca de los receptores neuronales para afectar la neurotransmisión. Un sistema de

modulación de características especiales parece ser el mediado por factores neurotróficos que activan receptores para neurotrofinas (Rft). Las vías de señalización intracelular para factores neurotróficos incluyen activación de genes nucleares, lo mismo que muchas vías intracelulares para cito/quimioquinas).

Simultáneamente, en estas situaciones de lesión, involución, degeneración o reparación del SN se producen cambios gliales muy profundos en todos los tipos gliales (“gliosis”) que tienen grandes repercusiones en la estructura funcional del SN (16-22) (estos cambios serán tratados en la segunda parte de este comentario). Estos cambios tienen una muy diferente significación, desde la neuroprotección a la neurotoxicidad y pueden ser base para el diagnóstico o el tratamiento de las enfermedades del SN, especialmente aquellas que todavía no tienen tratamiento, como las enfermedades neurodegenerativas. El problema surge cuando no podemos distinguir los cambios adaptativos (neuroprotectores) de las alteraciones “glioinvolutivas”/“gliodegenerativas” (neurotóxicas) (28).

Nuestros conocimientos sobre la patogenia de la EA y enfermedades neurodegenerativas asociadas han aumentado, en gran manera, cuando se han ido incorporando los resultados de las investigaciones sobre los cambios producidos en los elementos de las tres familias de células gliales (16-22,28). En el enunciado de las teorías o en la descripción de las cascadas patogénicas que intentan explicar la EA figuran, de manera sistemática, astrocitos, oligodendrocitos y células de microglia, así como las sustancias normales o patológicas que fabrican y segregan (factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, radicales libres, óxido nítrico, etc). Sin embargo, todavía nuestros conocimientos no son lo suficientemente pormenorizados como para definir dianas terapéuticas gliales para diferentes fases de este proceso.

2. LAS CÉLULAS GLIALES. LAS FAMILIAS, TIPOS Y SUBTIPOS MORFOFUNCIONALES DE LA NEUROGLIA

El primitivo concepto de “neuroglia” (“cemento nervioso” de Virchow, 1858, (29)) se refería especialmente a una especie de sustancia o tejido conectivo cerebral en el que se apreciaban corpúsculos, núcleos y un cierto número de células. Los estudios posteriores, entre los que destacan los de los neurohistólogos españoles (30-38), hicieron que se definiera la “neuroglia” como un complejo conjunto de tipos celulares, agrupados en tres distintas familias, que acompañaban a las neuronas y que no comprendía ningún tipo de sustancia intersticial. Simultáneamente, y con la excepción del último componente celular diferenciado, la microglia, la sensación de que la “neuroglia” derivaba del mesodermo como otros tejidos conectivos se esfumaba y daba paso a la teoría neuroepitelial.

La primera familia, que actualmente denominamos astrogliosis (y a sus elementos, astrocitos) comprende diferentes subtipos, tanto descritos bien de manera general en todo el SNC (astrocitos protoplasmáticos de la sustancia

gris y astrocitos fibrosos de la sustancia blanca), bien de forma restrictiva situados en zonas muy concretas del SNC (las células de Müller en la retina, las células epiteliales de Golgi que dan origen a las fibras de Bergmann) y las células de la glia radial, probable origen de muchos tipos estrellados. La segunda y tercera familia de células gliales nacen emparentadas tras los trabajos de Pio del Rio Hortega (36-38) (“El tercer elemento” *después de las neuronas* (“primer elemento”) y de las “células (astro-)gliales”-Cajal (33) y del Río-Hortega (36)). Los estudios más pormenorizados sobre estas nuevas células gliales concluyeron en la definición de dos nuevas familias: la oligodendroglia, de origen neuroepitelial, con elementos celulares de gran tamaño (junto a la astroglia configuran la macroglia) y relacionados especialmente con la mielinización, y la microglia, de origen mesodérmico, formada por elementos pequeños de diferentes morfologías.

Cada una de las tres familias de células neurogliales incluye diferentes tipos celulares con características bien definidas en algunos casos pero no en otros. Los criterios que se utilizan en la tipificación son variados: morfológicos, funcionales o morfofuncionales. Las primeras clasificaciones de las células gliales se basaban en la morfología de las células tras tinciones “específicas” (especialmente impregnaciones metálicas). Posteriormente, con la llegada de la inmunocitoquímica se pudo precisar mejor las diferentes tipos y subtipos de cada familia aunque se perdiera la caracterización morfológica precisa.

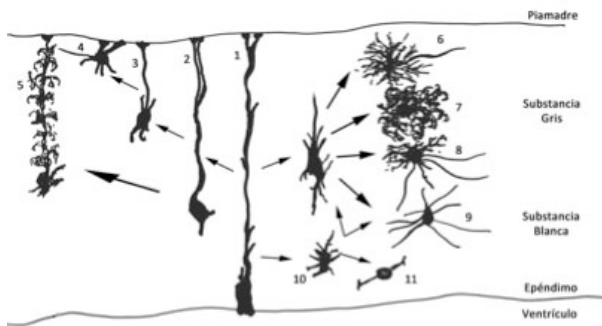


Figura 4. Esquema sobre los tipos morfológicos de astroglia y sus posibles relaciones. De manera general, en el mamífero adulto, se puede considerar que existen dos tipos principales: a) células con una larga prolongación, o un corto número de ellas en paralelo, que, en principio, se dirigen hacia la piamadre y se ponen en contacto con ella, y b) células estrelladas con gran número de prolongaciones cortas, y algunas largas, que se ponen en contacto con los vasos sanguíneos. En el primer grupo se incluyen los tanicitos(1) (células similares a las células primitivas ependimarias radiales que dan origen a neuronas y células gliales, y que están restringidas, en mamíferos adultos, a zonas del SNC de escaso espesor, como los órganos periventriculares); las células radiales del hipocampo (2, 3) y las “células epiteliales de Golgi” del cerebelo (o “células productoras de las fibras de Bergmann -mal llamada “glia de Bergmann”) (5), que forman empalizadas de fibras ascendentes hacia la piamadre; y los astrocitos marginales (4) de las primeras capas de las cortezas cerebrales, que poseen fibras radiales muy cortas hacia

la pia y otras prolongaciones hacia el interior de las capas corticales. En el segundo grupo de las células estrelladas (o de forma de araña) se encuentran los dos tipos más frecuentes, los astrocitos protoplasmáticos de la sustancia gris (6) (con prolongaciones muy ramificadas que cubren amplias áreas, especialmente en los humanos, creando “microdominios” sinápticos neuronales) y los astrocitos fibrosotípicos de la sustancia blanca (9) (con prolongaciones largas y poco ramificadas). Existen en la sustancia gris elementos transicionales mixtos (7) así como astrocitos velamentosos(8) con láminas no fibrilares recubriendo las neuronas o sus prolongaciones. Cada región del SN posee una especial astroglioarquitectura. También existen células germinales o astroblastos, generalmente periventriculares, que pueden dar lugar a nuevos astrocitos en la edad adulta y células de un nuevo tipo descrito, NGR2+ (con características de astrocito y oligodendrocito), e incluso, neuronas o células de estirpe oligodendroglial. Las flechas señalan las posibles relaciones evolutivas entre los distintos elementos. Mediante técnicas inmunocitoquímicas, se diferencian dentro de muchos subtipos morfológicos diversos subconjuntos con fenotipos característicos.

2.1. Astroglia.

Comprende el mayor número de tipos y elementos celulares (Figuras 4 y 5). Morfológicamente los astrocitos son muy variados en tamaño y forma, y muchos de los tipos son muy específicos de concretas regiones del SNC. Inmunocitoquímicamente, se ha querido identificar el astrocito como célula que contiene proteína fibrilar acidófila (GFAP), específica de las gliofibrillas, pero existen subtipos que no expresan o acumulan esta proteína (28). Además, existen diversas isoformas de GFAP con funcionalidad distinta (39). Un tipo morfológico de “astrocito” que no expresa GFAP pero que tiene algunas otras características astrocitarias (40) y que tiene expresión de NG2 chondroitin-sulfato proteoglicano (41), es la célula glial NG2+. Parece ser un tipo bien definido que pudiera establecer un nexo con la otra familia de la macroglia, la oligodendroglia, pues es capaz de actuar como pro-oligodendrocito así como dar lugar a neuronas.

En el desarrollo prenatal sus células están implicadas en la neurogénesis y la migración de neuroblastos/neuronas para constituir las capas o zonas de las diversas regiones del SNC y en la conducción de axones para establecer los circuitos neuronales. En el desarrollo postnatal, se ocupan de la configuración de áreas específicas de contacto sináptico (“microdominios”, “compartimentos” o “territorios gliales”) tutelados por una o varias células astrocitarias. Los astrocitos humanos son mucho más complejos que los que existen en otros mamíferos, y los “dominios” comprenden un número mucho más elevado de sinapsis (43). En el adulto, la modulación de la neurotransmisión y la gliotransmisión, tal como se ha dicho, son cruciales en la funcionalidad de los circuitos neuronales. El óptimo funcionamiento de las neuronas y de sus contactos neuronales, que son la clave para que los circuitos nerviosos cumplan su cometido durante toda la vida del ser, se asienta en gran medida sobre dos pilares, la estrecha relación/cooperación astroglio-neuronal y la interrelación de los cambios

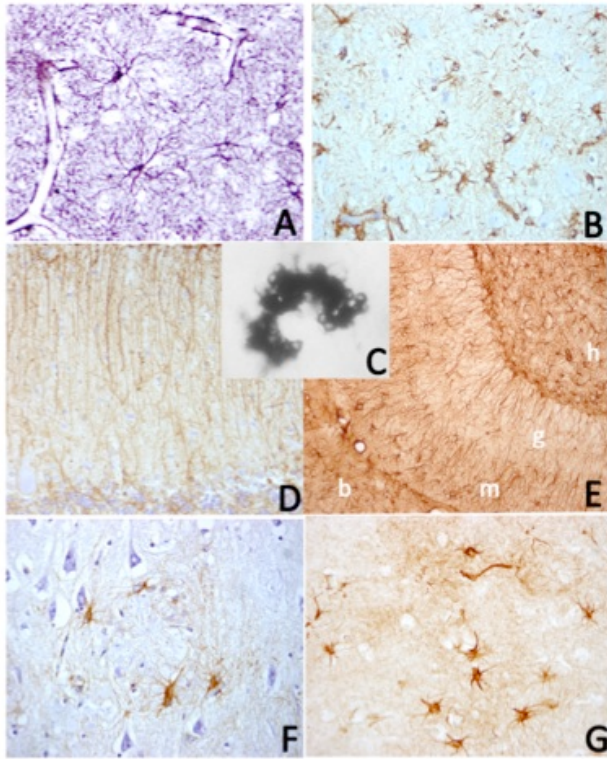


Figura 5. Diferentes tipos de células astrocitarias. A) Células astrocitarias protoplasmáticas estrelladas, normales e hipertróficas, de la capa V de la corteza cerebral frontal humana senil normal, delimitando “microdominios” en los que existen diverso número de neuronas (espacios circulares en blanco). Muchos de las prolongaciones finalizan sobre los vasos formando los “pies chupadores”. Inmunotinción con anti-Proteína Fibrilar Acidófila intensificada con níquel para mostrar las finas ramificaciones de las prolongaciones gliales principales. B) Células astrogliales estrelladas hipertróficas presentes en la corteza cerebral de un enfermo de Alzheimer. Se observan como elementos astrogliales estrellados hipertróficos que parecen rodear una estructura anómala no teñida (depósitos de amiloide difuso) o se sitúan entre las neuronas de la capa V. Inmunotinción con anti-Proteína Fibrilar Acidófila contrastada con hematoxilina. C) Astrocito velamentoso cuya prolongaciones laminares rodean células grano de la capa granular cerebelosa humana. Impregnación metálica (variante de Golgi) D) Fibras de Bergmann, prolongaciones de la glía epitelial de Golgi situada en la capa de Purkinje de la corteza cerebelosa. Inmunotinción con anti-Proteína Fibrilar Acidófila contrastada con hematoxilina. E) Diferentes tipos de astroglía radial en la capa granular (g) y molecular (m) del *girus dentatus* del hipocampo, y de astrocitos estrellados en el hilus/C4 (h) y cuerpo calloso (b). Inmunotinción con anti-Proteína Fibrilar Acidófila sin contraste. F-G) Células astrogliales que rodean una placa amiloide en CA3 del hipocampo (F) y en capa V de la corteza cerebral (G), de un enfermo de Alzheimer. Los astrocitos hipertróficos rodean las placas, como si quisieran formar una cicatriz glial, y sus prolongaciones penetran en ellas, aunque en G se observa que algunas formaciones amiloideas no tienen esta relación de los elementos gliales con los acúmulos neuropatológicos. Inmunotinción con anti-Proteína Fibrilar Acidófila con contraste con hematoxilina (F) y sin contraste (G). Ampliación 250x.

Esta estrecha relación neuro-astroglial es súmamente compleja y comprende múltiples procesos de comunicación celular neuro-gliales, glio-neuronales, neuro-neuronales y glio-gliales, no neurotransmisores y neurotransmisores, en los que participan gran número de sustancias muy diversas (neurotransmisores, neurotrofinas, quimioquinas, citoquinas, NO, prostaglandinas, iones, radicales libres, etc, así como están implicadas todas las vías intracelulares de segundos mensajeros) (Figuras 1-3) (44). Además de las interrelaciones de las neuronas con sus astrocitos acompañantes, la conexión entre astrocitos mediante las “uniones estrechas” (“*gap junctions*”) y sus relaciones con los vasos mediante los pies vasculares, permiten establecer unidades metabólicas y funcionales neuro-glio-vasculares bien definidas en muchas regiones del SN (26). Algunos autores han descrito un “sistema glinfático” (“*glymphatic system*”) (45) basado en la astroglía, que haría las veces del sistema linfático en el resto de tejidos que poseen componente conjuntivo, en donde la captación de sustancias del espacio intercelular del neuropilo mediatizada por aquaporinas, su flujo a través de las *gap junctions* y su eliminación por los pies vasculares serviría de sistema de depuración de sustancias tóxicas del cerebro como el amiloide. En la adaptación de las conexiones neuronales y en los fenómenos de neuroplasticidad, es fundamental la glioplasticidad de los elementos astrocitarios para optimizar las respuestas tanto a las fluctuaciones normales del medio interno como a las señales que provienen de fuera del cerebro. En situaciones más complejas, como agresiones traumáticas o toxoinfecciones, procesos involutivos seniles o enfermedades neurodegenerativas, las células astrocitarias sufren cambios mucho más profundos (astrogliosis) que se manifiestan histológica e histoquímicamente de manera más llamativa.

2.2. Oligodendroglia

Puede ser definida esta familia glial, como la glía encargada de producir las envolturas mielínicas de los axones del SNC. Sin embargo, también se incluyen tipos de células que no producen mielina y que tienen diferentes funciones neurometabólicas o de otro tipo (por ejemplo, como precursores gliales). Desde los primeros trabajos de Rio-Hortega (36-38) las células mielinizantes fueron subdivididas en cuatro subtipos I-IV con los criterios relacionados con el número de axones que se envuelven y el grosor de los mismos. Actualmente se consideran solo dos tipos I-II y III-IV que envuelven, respectivamente, muchos finos axones o pocos axones de gran diámetro. Sólo algunos subtipos mielinizantes han podido ser identificados específicamente con anticuerpos.

2.3. Microglía

La tercera familia glial difiere grandemente de las dos anteriores por su procedencia mesodérmica (36-38). La similitud de comportamiento de las células de microglía con algunas de las células que intervienen en los procesos inmunitarios y la inflamación en los tejidos periféricos que poseen componentes celulares mesodérmicos, así como la

utilización de macromoléculas (citoquinas y quimioquinas, y sus receptores) claves en estos procesos, han llevado a la microglía al primer plano de los estudios neuropatológicos y neurodegenerativos. Se ha definido, un proceso degenerativo denominado “neuroinflamación” donde la pieza angular es la célula de microglía (46,47).

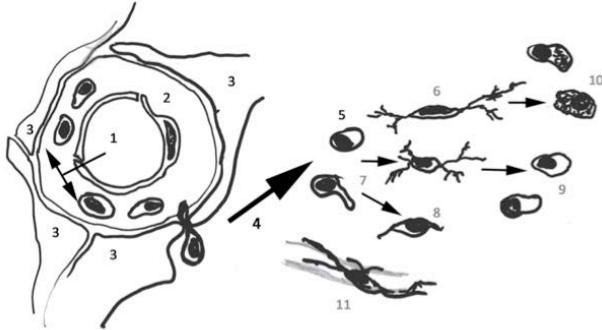


Figura 6. Esquema sobre los tipos morfológicos de microglía y sus posibles relaciones. En el parénquima nervioso existen tipos morfológicos diferentes, desde formas alargadas con prolongaciones más o menos ramificadas (6) hasta formas redondeadas con muy escasas prolongaciones (5, 7, 9, 10). Ha sido muy discutida la identidad o diferencia entre los monocitos/macrófagos que se encuentran en otros tejidos y fuera del parénquima del SN (2) y las células de microglía del parénquima (siendo la frontera la *glia limitans* perivascular o pial de carácter astrocitario -3), tanto las formas ramificadas como redondeadas. En la actualidad se considera que en las primeras fases del desarrollo embrionario, macrófagos procedentes del saco embrionario colonizan el SNC, pasando de la luz vascular (1) a los espacios de Virchow-Robin (2) y de allí al parénquima nervioso (4, 5), diferenciándose en células de microglía adultas, generalmente con muchas ramificaciones (6), aunque algunas de ellas mantienen formas más redondeadas (7, 8) que se extienden por el parénquima o bien quedándose adosados a los vasos sanguíneos (11). Algunos elementos ramificados, al activarse ante cambios del medio ambiente, cambian a formas redondeadas sin prolongaciones, que son especialmente células fagocitarias (9, 10). También permanecen durante toda la vida formas blásticas que se dividen en las situaciones patológicas en que existe microgliosis. Todos estos tipos se consideran la “microglía residente” ya que en circunstancias patológicas, nuevos monocitos/macrófagos generados en la médula ósea dan lugar a una nueva “microglía invasora”. Inmunoquímicamente se diferencian muchos subtipos/subconjuntos con fenotipos característicos.

Desde su descripción inicial se consideran dos tipos morfológicos básicos de microglía a) células pequeñas con prolongaciones cortas y ramificadas y b) células redondeadas sin prolongaciones (Figuras 6 y 7). Ambas se sitúan en neuropilo o bordeando los vasos sanguíneos. De alguna manera se consideraba que ambos tipos de elementos estaban relacionados y que eran diferentes estados funcionales, así como que existía una transición de la microglía residente, generalmente con prolongaciones, a la activada sin prolongaciones. Al ME distinguen 2 subtipos: a) productor de amiloide b) fagocítico (48). Los cambios plásticos y reactivos de las células de microglía se acompañan casi siempre con cambios en la expresión

génica, de manera que pueden diferenciarse muchos fenotipos con características morfológicas, inmunoreactividad general y patrones específicos de depósitos intracelulares empleando diversos sistemas de inmunotinción de distintas proteínas mesodérmicas (CD45; CD68; Iba1, LN3; etc) (49,50). Asimismo, la caracterización de los subconjuntos de células de microglía según las citoquinas/quimioquinas que poseen o los receptores para estas sustancias que existen en sus membranas, es una herramienta de gran utilidad para el estudio del papel de la microglía.

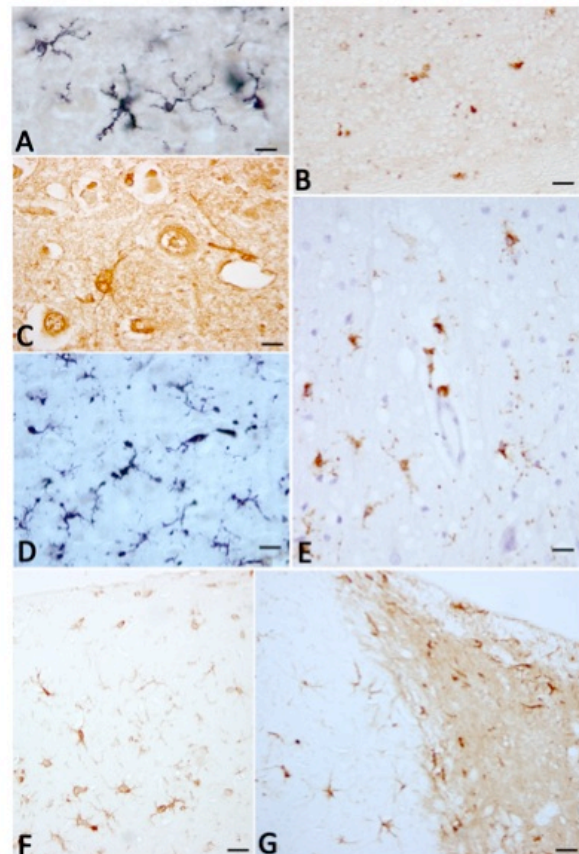


Figura 7. Diferentes tipos de células de microglía. Las células de microglía presentan diferentes morfologías según las diferentes técnicas de impregnación metálica o de inmunotinción que se emplean. Ello se debe a que muchas de las sustancias que las tiñen solo detectan algunos subtipos funcionales, normales o hipertrofos, y también a que las sustancias inmunorreactivas tienen localizaciones precisas en el cuerpo o en las prolongaciones. La mayoría de las técnicas inmunocitoquímicas tienden a detectar sustancias antigénicas solo encontradas en células de estirpe mesodérmica. A) Células microgliales con prolongaciones ramificadas inmunoteñidas con LN3 (anticuerpo contra el antígeno mayor histocompatibilidad) en la corteza cerebral humana, capa V. B) Células microgliales redondeadas pequeñas infiltradas entre las células grano de la corteza cerebelosa humana inmunoteñidas con CD45 (glicoproteína de los leucocitos). C) Células microgliales hipertrofos con prolongaciones o del tipo redondeado sin prolongaciones inmunoteñidas con lectina de tomate, en corteza cerebral humana. D) células fusiformes con finas prolongaciones en la corteza cerebral humana inmunoteñidas con CD68 (glicoproteína

conocida como macrosialina, sialomucina de células mesodérmicas) e intensificado con níquel. E) Células microgliales hipertróficas con grandes prolongaciones ramificadas detectable por la acumulación de granos de proteína CD45 en corteza cerebral humana. F-G) Células de microglía con prolongaciones ramificadas, algunas de las cuales asemejan astrocitos radiados en la corteza cerebral (capa I-III) (F) y capa molecular de la región del *girus dentatus* del hipocampo (G), inmunoteñidas con Iba-1 (proteína inflamatoria AIF-1). A-C: cerebro humano de un caso de Alzheimer. D-E: cerebro humano de un caso de Creutzfeldt-Jakob. F-G: cerebro de mono (*Macaca fascicularis*) de 36 años de edad. Barras: A y E=30µm; B=20µm; C= 12µm; C, F y G= 60 µm.

3. LA PLASTICIDAD GLIAL Y LA ACTIVACIÓN O RESPUESTA GLIAL

Vivir supone responder adecuadamente a las circunstancias normales y anormales del medio ambiente externo e interno. Los circuitos neuronales encargados de promover y dirigir las respuestas del organismo deben adaptarse continuamente para optimizar estas respuestas. Las neuronas que integran estos circuitos deben realizar cambios morfológicos y funcionales para adaptarse. Podemos considerar que las neuronas son las células que poseen la mayor capacidad adaptativa de las células de los organismos. Sin embargo, muchos de los cambios, por no decir todos, que tienen lugar no sólo implican modificaciones neuronales (neuroplasticidad) sino que también implican modificaciones de los elementos de las tres familias gliales acompañantes (glioplasticidad). En muchas ocasiones no podremos decir si el promotor del cambio es un elemento neuronal o un elemento glial, pero si se observa que las modificaciones neuronales y gliales corren en paralelo. Una falta de adaptación glial o un exceso en la respuesta adaptativa puede generar una situación patológica. Un claro ejemplo de acoplamiento de neuroplasticidad-glioplasticidad lo tenemos en los cambios que ocurren a nivel sináptico en circuitos que realizan funciones cognitivas. Las envolturas astrogiales perisinápticas cambian de tamaño y forma alrededor de los complejos sinápticos al tiempo que neurotrofinas producidas por estas células y macromoléculas relacionadas con la neurotransmisión intervienen en la regulación de la transmisión sináptica a este nivel. Pero no sólo estos elementos gliales son las que cooperan en la adaptación, sino que también las células de microglia.

Como se dijo, en situaciones anormales, con grandes cambios del medio interno o externo en los que se requieren cambios adaptativos más importantes, las modificaciones de las células gliales se hacen mucho más notorias (“gliosis”). Estos cambios se analizan en la segunda parte.

4. REFERENCIAS

1. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6:626-40.
2. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for

- astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 2003; 26:523-30.
3. Vernadakis A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 1996; 49:185-214.
4. Viola GG, Rodrigues L, Américo JC, et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res* 2009; 1274:47-54.
5. Ota Y, Zanetti AT, Hallock RM. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast* 2013, Article 2013:185463 doi: 10.1155/2013/185463.
6. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34(2):76–87 (2011).
7. Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bergersen LH, Bjaalie JG, Eriksson J, Gundersen V, et al. The glia doctrine: addressing the role of glial cells in healthy brain ageing. *Mech Ageing Dev* 2013; 134:449-59.
8. Perez-Alvarez A, Navarrete M, Covelo A, et al. Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *J Neurosci* 2014; 34:12738-44.
9. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, et al. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 2014; 81:728-39.
10. Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci*. 2014 8:106. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00106. eCollection.
11. Xavier AL, Menezes JR, Goldman SA, et al. Fine-tuning the central nervous system: microglial modelling of cells and synapses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1654).
12. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 2014; 158:15-24.
13. Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, et al. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011; 31:16064-69.
14. Morris GP, Clark IA, Zinn R, et al. Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem* 2013; 105:40-53.
15. Papa M, De Luca C, Petta F, et al. Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 42:35-54.
16. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 2013; 81:1079-88.
17. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; 121:4-27.
18. Mosher KI, Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2014; 88(4):594-604.
19. Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, et al. Astroglia

- in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 2009; 16(3):378-85.
20. Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol* 2013; 8:149-58.
 21. Verkhratsky A, Marutle A, Rodríguez-Arellano JJ, *et al.* Glial Asthenia and Functional Paralysis: A New Perspective on Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist* 2014. pii: 1073858414547132.
 22. Mitew S, Kirkcaldie MT, Dickson TC, *et al.* Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34:2341-51.
 23. Martineau M. Gliotransmission: focus on exocytotic release of L-glutamate and D-serine from astrocytes. *Biochem Soc Trans* 2013; 41:1557-61.
 24. Martineau M, Shi T, Puyal J, *et al.* Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci* 2013; 33:3413-3423.
 25. Sloan SA, Barres BA. Looks can be deceiving: reconsidering the evidence for gliotransmission. *Neuron* 2014; 84:1112-15.
 26. Agnati LF, Cortelli P, Pettersson R, *et al.* The concept of trophic units in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1995; 46:561-74.
 27. Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8:378. doi: 10.3389/fncel.2014.00378.
 28. Alvarez MI, Rivas L, Lacruz C, *et al.* Astroglial cell subtypes in the cerebella of normal adults, elderly adults, and patients with Alzheimer's disease: A histological and immunohistochemical comparison. *Glia* 2015; 62:287-312.
 29. Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.* Berlin: Verlag 1858.
 30. Retzius G. *Die Neuroglia des Gehirns beim Menschen und bei Säugethieren: Die Neuroglia des Kleinhirns. Biologische Untersuchungen. Neue Folge VI: 1894; pp 16-20.*
 31. Bergmann C. *Notiz über einige Strukturverhältnisse der Cerebellum und Rückenmarks.* *Z Rationelle Med* 1857; 8:360-63.
 32. Golgi C. *Sulla fina anatomia del cervello umano. Lecture, Ist. Lomb Sci Lett. (Milano) 8, January (1874). (Reprinted 1903, in: Opera Omnia, vol. I: Istologia normale, 1870-1883. Milan: Ulrico Hoepli. p 99-111).*
 33. Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés (translated by L. Azoulay), vols I and II. Paris: Maloine (1909-1911). (Reprinted 1952 and 1955. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas).*
 34. Ramón y Cajal S. *Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. Trab Lab Invest Biol* 1913; 11:255-315.
 35. Terrazas R. *Notas sobre la neuroglia del cerebelo y el crecimiento de los elementos nerviosos. Rev Trim Micrográf* 1897; II 49-65.
 36. Del Río Hortega P. *El 'tercer elemento' de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglia. Bol Soc Esp Biol* 19019; 8:68-82.
 37. Del Río Hortega P. *La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia). Bol Real Soc Esp Hist Nat* 1921; 21:63-92.
 38. Del Río Hortega P. *Histogénesis y evolución normal, éxodo y distribución regional de la microglia. Memorias Real Soci Esp Hist Nat* 1921; 11:213-68.
 39. Kalman M. *GFAP expression withdraws—a trend of glial evolution? Brain Res Bull* 2001; 57:509-11.
 40. Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK. *Electrophysiologically "complex" glial cells freshly isolated from the hippocampus are immunopositive for the chondroitin sulfate proteoglycan NG2. J Neurosci Res.* 2003; 73:765-77.
 41. Levine JM, Card JP. *Light and electron microscopic localization of a cell surface antigen (NG2) in the rat cerebellum: association with smooth protoplasmic astrocytes. J Neurosci.* 1987; 7(9): 2711-20.
 43. Oberheim NA, Takano T, Han X, *et al.* *Uniquely hominid features of adult human astrocytes. J Neurosci* 2009; 29:3276-87.
 44. Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A. *Diversity and variability of the nicotine effects on different brain cortical regions. Therapeutic and toxicologic implications. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 2010; 10:180-206.
 45. IJff JJ, Nedergaard M. *Is there a cerebral lymphatic system? Stroke* 2013; 44(6 Suppl 1):S93-5.
 46. Wyss-Coray T, Rogers J. *Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1):a006346.
 47. Meraz-Ríos MA, Toral-Ríos D, Franco-Bocanegra D, *et al.* *Inflammatory process in Alzheimer's Disease. Front Integr Neurosci* 2013; 7:59. doi: 10.3389/fnint.2013.00059.
 48. Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC. *Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. Acta Neuropathol* 1992; 84:225-33.
 49. Masliah E, Mallory M, Hansen L, *et al.* *Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol* 1991; 83:12–20.
 50. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, *et al.* *Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res Mol Brain Res* 1998; 57:1–9 (1998).



About the vibrational spectroscopy in the diagnosis of Alzheimer's disease

Title in Spanish: *Sobre la espectroscopía vibracional en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer*

P. Carmona^{1*}, E. López-Tobar¹, M. Molina², A. Toledano^{3,4}

¹Instituto de Estructura de la Materia (CSIC), Serrano 121, 28006 Madrid. ²Escuela Universitaria de Óptica, Universidad Complutense, Madrid. ³Instituto Cajal (CSIC), Av. Dr. Arce 37, 28002 Madrid. ⁴Académico Correspondiente de la RANF

ABSTRACT: Two-dimensional correlation vibrational spectroscopy is emerging as an alternative technique to detect relatively small alterations in composition and molecular structure of complex biological systems such as blood plasma resulting from pathological, physical and chemical processes occurring in body. In this paper the main concepts considered in the use of infrared and Raman spectroscopies in their two-dimensional form and their application in the search for markers for the diagnosis of Alzheimer's disease are described. Some examples of representation of spectral markers in ROC curves showing accuracies in classifications of samples greater than 80% are also discussed.

RESUMEN: La espectroscopía vibracional de correlación bidimensional surge como una técnica alternativa para la detección de cambios relativamente pequeños en la composición y/o estructura molecular de sistemas biológicos complejos como es el plasma sanguíneo, derivados de procesos patológicos, físicos y químicos que tienen lugar en el organismo. En este trabajo se describen los principales conceptos que se consideran en el uso de la espectroscopía infrarroja y Raman en su modalidad bidimensional y su aplicación en la búsqueda de marcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo se describen algunos ejemplos de representación de marcadores espectrales en curvas ROC indicativas de un grado de exactitud en la clasificación de muestras superior al 80%.

*Corresponding Author: p.carmona@iem.cfmac.csic.es An Real Acad Farm Vol. 81, N° 1 (2015), pp. 19-24

Received: January 21, 2015 Accepted: February 24, 2015

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

En los próximos 50 años se espera que la enfermedad de Alzheimer (EA) afecte a 100 millones de personas en el mundo. Es de sobra conocido que las características patofisiológicas más importantes de la enfermedad de Alzheimer son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. El componente mayoritario de dichas placas es el péptido β -amiloide ($A\beta$). Este péptido de 39-43 aminoácidos es muy hidrofóbico, se libera en la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloidea (APP) y se agrega para formar oligómeros. Estos oligómeros a su vez se agregan para formar fibras, que se depositan en el parénquima cerebral y originan las placas seniles (1). Los efectos neurotóxicos del péptido $A\beta$ implican también cambios en la composición y estructura de las membranas neuronales, afectando a sus propiedades fisicoquímicas. Uno de los mayores retos respecto a esta enfermedad neurodegenerativa reside en la consecución de un método de diagnóstico precoz con vistas a la administración de un tratamiento adecuado. En la actualidad el diagnóstico definitivo más eficaz está limitado a un examen *post-mortem*. En la enfermedad de Alzheimer, el diagnóstico clínico se hace por exclusión tras estudiar el especialista si existe una demencia y no

encontrar ningún síntoma o signo que explique la causa de la misma.

Otros procedimientos actuales incluyen la identificación de marcadores para el diagnóstico clínico precoz de la EA utilizando técnicas de imagen tales como las de resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía por emisión de positrones (PET) (2). Pero estos procedimientos son generalmente muy caros, y la disponibilidad de instrumentación al respecto no se ha generalizado. Existen también técnicas alternativas de diagnóstico de la EA tales como pruebas genéticas y ensayos neuroquímicos de fluidos corporales. En el caso de las pruebas genéticas, existe una asociación significativa del alelo $\epsilon 4$ ($\epsilon 4$) de la apolipoproteína E (ApoE) con la EA de inicio tardío, pero la genotipificación de la ApoE no se recomienda actualmente como estrategia regular de la EA debido a la baja sensibilidad y especificidad (3).

Los biomarcadores en fluidos corporales tales como LCR, plasma y suero podrían ser utilizados para incrementar la exactitud del diagnóstico del deterioro cognitivo leve (DCL) y la predicción de su evolución. El LCR es un buen recurso para la investigación en enfermedades neurodegenerativas, pero su aplicación

clínica está limitada por la naturaleza invasiva del procedimiento, especialmente en poblaciones de edad avanzada, y la exigencia de personal altamente capacitado, por lo que es inadecuado para la aplicación rutinaria. El plasma es un fluido corporal complejo que contiene proteínas, péptidos, lípidos y metabolitos que reflejan la actividad fisiológica y patología en diversos órganos corporales, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). En seres humanos, aproximadamente 500 mL de LCR se absorben en la sangre diariamente (4), lo que hace a la sangre una fuente adecuada de biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas. La facilidad de una punción venosa en comparación con una punción lumbar permite repetitividad, lo que hace adecuada su aplicación en ensayos clínicos para el diagnóstico de la EA y evaluar tratamientos modificadores de esta enfermedad.

La espectroscopía vibracional (infrarroja y Raman) genera información analítica y estructural como consecuencia de las transiciones fundamentales entre niveles de energía vibracional reflejadas en bandas espectrales. Los espectros vibracionales se pueden considerar como huellas digitales utilizables en la identificación cualitativa o análisis cuantitativo de las especies moleculares en cuestión. En el caso del plasma sanguíneo utilizado como fuente de marcadores de la EA, los espectros vibracionales correspondientes serán el resultado de la superposición de espectros de las proteínas, péptidos, lípidos y metabolitos contenidos en el mismo. La espectroscopía infrarroja y Raman en su modalidad bidimensional (2D) permite el análisis de espectros complicados de sistemas biológicos complejos como el plasma sanguíneo, revelando incluso pequeños cambios en la composición y/o estructura molecular resultantes de procesos patológicos, físicos y químicos que tienen lugar en el organismo (5). En esta publicación se presentan ejemplos que ilustran el uso de la espectroscopía vibracional de correlación 2D en la búsqueda de marcadores que pueden ser útiles para el diagnóstico de la EA.

2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE CORRELACION BIDIMENSIONAL

La observación directa de una correlación entre una banda determinada y otras bandas del mismo espectro, o entre una banda infrarroja y otra Raman, es posible actualmente mediante la espectroscopía de correlación bidimensional (2D). Este método permite obtener información analítica-estructural variada que no se puede conseguir fácilmente a partir de un espectro monodimensional convencional. Aunque la idea básica de la espectroscopía vibracional de correlación 2D es similar a la de RMN 2D, los métodos de calcular los espectros de correlación son diferentes. En la espectroscopía vibracional de correlación 2D se calcula una correlación cruzada dinámica entre variaciones de intensidad de bandas inducidas por una perturbación externa (temperatura, tiempo, etc.) para obtener de este modo un espectro de correlación 2D

El espectro de correlación puede ser de tipo síncrono o asíncrono. En el espectro síncrono aparecen en la línea diagonal varios picos llamados picos de autocorrelación que corresponden a bandas correlacionadas consigo mismas. Cuanto mayor es el cambio de intensidad de una banda en respuesta a una perturbación externa (tal como un cambio de temperatura, tiempo, etc.), mayor es la intensidad de su pico de autocorrelación. Obviamente una banda que tiene una gran intensidad no necesariamente muestra un pico de autocorrelación fuerte. Por tanto, las bandas que se solapan en un espectro monodimensional se pueden observar como bandas separadas en espectros de correlación 2D a causa de sus diferentes niveles de respuesta a una perturbación. Los picos localizados fuera de la diagonal se llaman picos cruzados. La existencia de un pico cruzado a (ν_1, ν_2) en el espectro síncrono significa que dos bandas de frecuencias ν_1 y ν_2 cambian de manera similar una con respecto a otra en respuesta a una determinada perturbación. Un pico cruzado puede tener signo positivo o negativo. El signo es positivo cuando las intensidades de ambas bandas aumentan o disminuyen simultáneamente con una perturbación, y es negativo cuando una banda aumenta mientras que la otra disminuye.

Un espectro de correlación asíncrono proporciona información complementaria a la obtenida de un espectro de correlación síncrono, y carece de picos de autocorrelación. Un pico cruzado de frecuencias (ν_1, ν_2) en un espectro de correlación asíncrono significa que las intensidades de dos bandas a ν_1 y ν_2 presentan respuestas fuera de fase para una determinada perturbación. Por ejemplo, un pico cruzado aparece cuando las intensidades de dos bandas cambian a diferentes temperaturas, o cuando cambian en tiempos diferentes.

La utilidad de esta modalidad de espectroscopía vibracional se ha traducido en un número creciente de aplicaciones a lo largo de los últimos lustros en diversas áreas relacionadas con la espectroscopía óptica (6), bioquímica (7) (8) y química analítica (9). A continuación se presentan espectros de correlación síncronos infrarrojos y Raman obtenidos a partir de espectros medios de muestras de plasma sanguíneo extraído de un grupo de 35 pacientes con la EA (8, 16 y 11 en fases leve, moderada y grave, respectivamente) y de 12 controles sanos, de edades similares entre ambos grupos. Con este fin se ha utilizado el software denominado 2D-Pocha, escrito por los Dres. D. Adachi e Y. Ozaki (Kwansei-Gakuin University, Japan), programado sobre la base del algoritmo desarrollado de espectroscopía de correlación 2D generalizada (6).

3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro síncrono de la región infrarroja amida I se incluye en la Figura 1, en donde se advierte como autopico más intenso el situado en la diagonal y centrado hacia 1633 cm^{-1} , que es atribuible al aumento de concentración de estructura β -polipeptídica a lo largo del tiempo de evolución de la EA. Esta asignación es consistente con la presencia del autopico hacia 1690 cm^{-1} , que también es característico de estructura β -polipeptídica y está correlacionado

positivamente con el autopico hacia 1633 cm^{-1} . Este pico de la diagonal está a su vez correlacionado negativamente con el situado hacia 1656 cm^{-1} que se puede asignar a estructura α -helicoidal/desordenada sobre la base de consideraciones de frecuencias de grupo y de estructura secundaria de proteínas (10). Esta información estructural es consistente con la generada por la región entre 1350 y 990 cm^{-1} (Figura 2), en la que aparecen dos autopicos situados hacia 1298 y 1234 cm^{-1} que son atribuibles a α -hélices y estructura β -polipeptídica respectivamente (11) (10). Ambos picos están correlacionados negativamente como indica el pico cruzado a $(1298, 1234)$, debido al aumento de estructura β -polipeptídica y disminución de α -hélices.

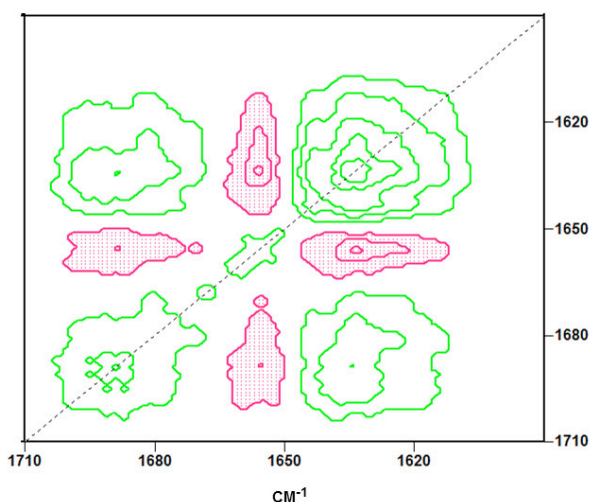


Figura 1. Espectro síncrono obtenido a partir de espectros infrarrojos medios en la región 1710 - 1590 cm^{-1} de plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA leve, moderada y grave.

Los lípidos son unos de los componentes del plasma más susceptibles del ataque por radicales libres inductores de peroxidación (12). La generación de productos muy reactivos que se forman en la peroxidación lipídica puede contribuir al daño celular y por tanto la medida de estos productos se ha usado habitualmente para evaluar el estrés oxidativo. Compuestos hidroxilados (por ejemplo, isoprostanos, hidroperóxidos) son productos de la peroxidación lipídica y se han descrito como marcadores de daño oxidativo en la EA (13). La espectroscopía infrarroja es muy sensible a la presencia de grupos hidroxilo, que se hacen visibles no solamente a través de las bandas de tensión OH sino también a través de las de tensión C-O (14). La presencia de algunos restos de agua puede interferir con medidas cuantitativas de grupos hidroxilo en la región de tensión OH a lo largo de la EA. Por tanto, una región alternativa para este fin puede ser la comprendida entre 1150 y 1000 cm^{-1} como se muestra en la Figura 2. Un amplio autopico que abarca desde 1135 a 1000 cm^{-1} aproximadamente aparece en este espectro síncrono y es atribuible a vibraciones de tensión C-O. Este autopico está correlacionado positivamente con el situado

hacia 1234 cm^{-1} como consecuencia del aumento simultáneo de concentraciones de estructura β -polipeptídica y compuestos hidroxilados derivados de la oxidación lipídica asociada al estrés oxidativo presente en la EA.

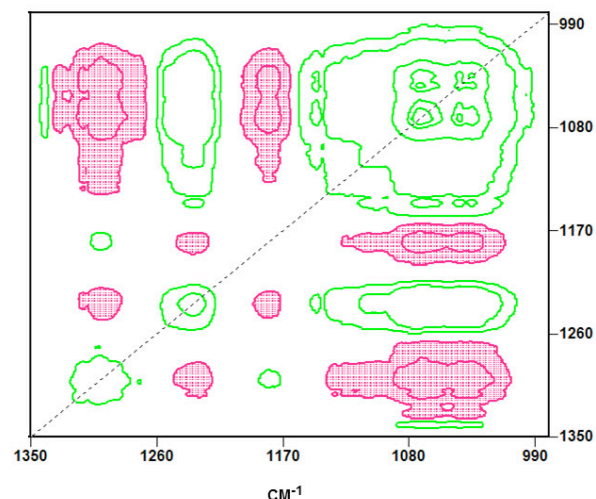


Figura 2. Espectro síncrono obtenido a partir de espectros infrarrojos medios en la región 1350 - 980 cm^{-1} de plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA leve, moderada y grave.

Los cambios de intensidad de algunas bandas infrarrojas puestos de manifiesto por espectroscopía de correlación bidimensional se han utilizado como marcadores de la EA en curvas ROC para evaluar pruebas diagnósticas de la EA. Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad. La sensibilidad de una prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad. Mide su capacidad para detectar la enfermedad cuando está presente. La especificidad de una prueba indica la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el sujeto en cuestión no tiene la enfermedad. Mide su capacidad para descartar la enfermedad cuando ésta no está presente. Las curvas ROC son gráficos en los que se observan todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el intervalo de resultados observados. En el eje de ordenadas se sitúa la sensibilidad (S) o fracción de verdaderos positivos calculada en el grupo de enfermos. En el eje de abscisas se sitúa la fracción de falsos positivos o 1-especificidad ($1 - E$), calculada en el grupo no afectado por la enfermedad. Cada punto de la curva representa un par S/1-E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados entre las poblaciones de sujetos sanos y enfermos, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, en donde S y E toman valores máximos (S y $E = 1$). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos grupos, da lugar a una línea diagonal de 45° , desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La

mayoría de las curvas ROC caen entre estos dos extremos. Cualitativamente, cuanto mayor es el área encerrada entre la curva ROC y la diagonal más alta es la exactitud global del método de diagnóstico.

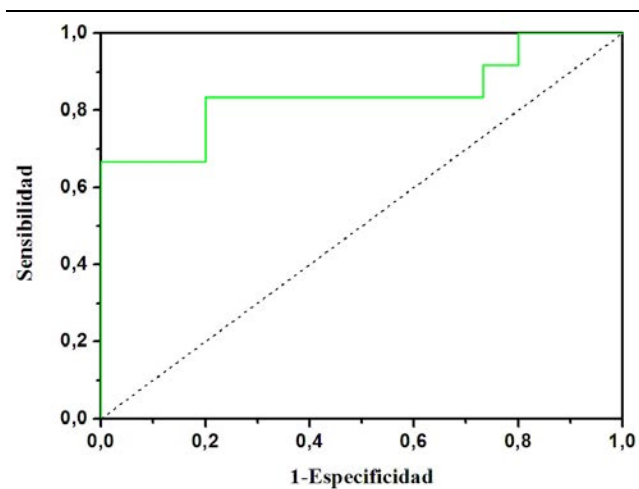


Figura 3. Curva ROC obtenida mediante la intensidad del perfil espectral entre 1639 y 1624 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA en fase leve.

La Figura 3 muestra una curva ROC obtenida mediante la intensidad del perfil espectral entre 1639 y 1624 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de 15 sujetos sanos y 12 sujetos enfermos con la EA en fase leve. El porcentaje del área comprendida entre la curva ROC y la diagonal, que indica el porcentaje de exactitud en las clasificaciones de muestras, es aproximadamente 84%. Este disminuye a 75% si en el grupo de pacientes se incluyen los de EA moderada (resultados no mostrados), lo que se puede explicar teniendo en cuenta que la formación de péptidos β -amiloides contribuye al aumento de intensidad en esta región infrarroja (11) (10), y su concentración va disminuyendo al pasar a fases más avanzadas (moderada, grave) de la EA (13). Por otra parte, la Figura 4 incluye una curva ROC resultante de medir la relación de intensidades a 1156 y 1171 cm^{-1} en dos grupos de plasma sanguíneo integrados por controles sanos y pacientes con EA leve y moderada. El porcentaje de área bajo la curva ROC es de aproximadamente 80%.

4. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Los resultados de espectroscopía Raman de correlación 2D son consistentes con los obtenidos por espectroscopía infrarroja. La Figura 5 muestra el espectro síncrono obtenido a partir de espectros Raman medidos en las regiones 1725-1600 cm^{-1} y 1000-900 cm^{-1} , que son características de la estructura secundaria de péptidos y proteínas. Sobre la diagonal aparecen dos autopicos situados a 1671 y 934 cm^{-1} que están correlacionados negativamente con el pico cruzado a (1671, 934) generado por un aumento de estructura β -polipeptídica y una disminución de α -hélices (15) a lo largo de la EA. El mencionado cambio espectral indicativo de aumento de estructura β y la disminución inherente de estructura α -helicoidal puede ser debido a la superposición

de señales espectrales de diversos componentes del plasma que aparecen en el curso de la EA y que se han descrito como posibles biomarcadores de esta enfermedad.

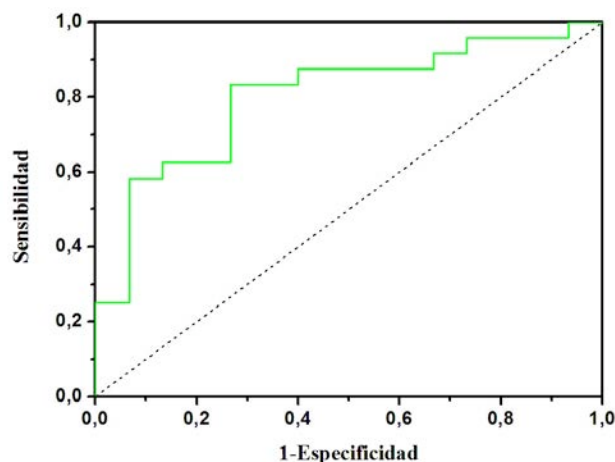


Figura 4. Curva ROC obtenida mediante la relación de intensidades 1156/1171 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA en fase leve y moderada.

Aparte de los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, en el plasma sanguíneo existen otras isoformas truncadas de péptidos amiloides tales como $A\beta_{37}$, $A\beta_{38}$ y $A\beta_{39}$ (18). En el SNC, los péptidos $A\beta$ se generan en el cerebro y son transportados al sistema vascular periférico a través de la barrera hematoencefálica (19), y también son segregados por las plaquetas en la sangre (20). Por otra parte, una proteína rica en estructura β -polipeptídica, la α -2-macroglobulina, se ha identificado a concentraciones elevadas en plasma sanguíneo de pacientes con la EA (4). La α -1-antitripsina se ha descrito también como componente del plasma asociado a la EA y posible biomarcador de esta enfermedad (21). Asimismo bajo este punto de vista se pueden mencionar otras proteínas ricas en estructura β -polipeptídica, tales como la transferrina (22) y α 1-antiquimitripsina (23) (24).

Así, dos péptidos de 40 y 42 aminoácidos ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$) derivados de la proteína precursora amiloide (APP) son los dos principales componentes de las placas seniles amiloides extracelulares (16). La mayoría de los péptidos $A\beta$ del plasma están unidos a la albúmina, y muy pocos de estos péptidos están en estado libre (17).

Otros cambios espectrales por debajo de 800 cm^{-1} se generan también al pasar de controles sanos a pacientes afectados con la EA (5), probablemente como consecuencia de alteraciones en la estructura terciaria y aumento de concentración de determinadas proteínas en el curso de esta enfermedad.

La Figura 6 incluye una curva ROC obtenida mediante la intensidad relativa de la banda amida I a 1671 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA en fase leve y moderada. El porcentaje de área incluida entre la curva y la diagonal es 86%, que equivale a la exactitud en la discriminación entre controles y pacientes.

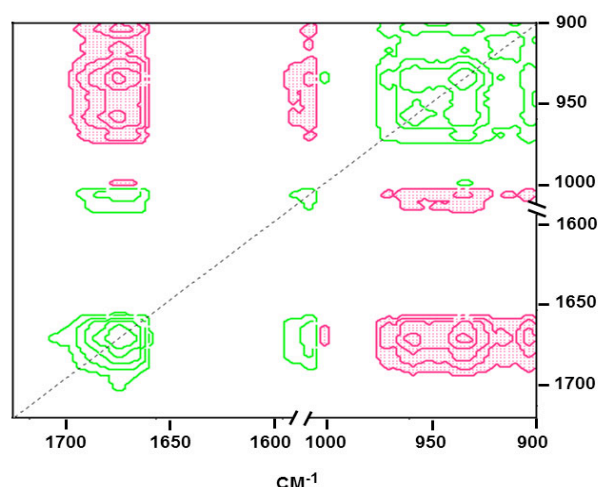


Figura 5. Espectro síncrono obtenido a partir de espectros Raman medidos en las regiones 1725-1600 cm^{-1} y 1000-900 cm^{-1} de plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA leve, moderada y grave.

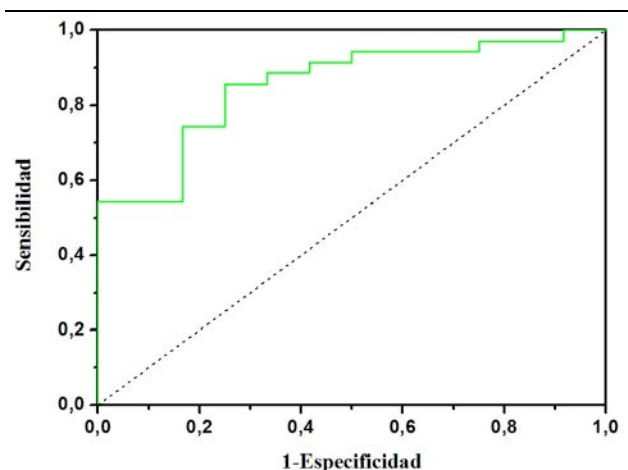


Figura 6. Curva ROC obtenida mediante la intensidad relativa de la banda amida I a 1671 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA en fase leve y moderada.

5. CONCLUSIONES

La espectroscopía de correlación 2D infrarroja y Raman puede detectar pequeños cambios espectrales que se originen en el curso de una determinada enfermedad y que representados en sus respectivas curvas ROC se puedan utilizar para el diagnóstico de la misma. Es el caso de los ejemplos anteriores referentes a la enfermedad de Alzheimer, para cuyo diagnóstico algunas regiones espectrales generan unas curvas ROC con un grado de exactitud en la clasificación de muestras superior al 80%. Por tanto se satisface el criterio propuesto por el National Institute on Aging (NIA) (25) en lo que respecta a la especificidad y sensibilidad que debe tener un biomarcador ideal para el diagnóstico de la EA. No obstante se proseguirá dando robustez a este método con la inclusión de más controles sanos y pacientes afectados por la EA.

6. AGRADECIMIENTOS

Gran parte de los trabajos aquí mencionados han sido subvencionados con un proyecto del Plan Nacional 2009 y un proyecto INNPACTO 2012, así como con un Convenio/Contrato CSIC-Lab. Raman-Health.

7. REFERENCIAS

1. Haass C. Take five-Bace and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J* 2004; 23: 483-88.
2. Hampel H, Burger K, Teipel SJ, *et al.* Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2008; 4: 38-48.
3. Patterson C, Feightner JW, Garcia A, *et al.* Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ* 2008; 178: 548-56.
4. Hye A, Lynham S, Thambisetty M, *et al.* Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 2006; 129: 3042-50.
5. Carmona P, Molina M, Calero M, *et al.* Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy. *J Alzheimer's Dis* 2013; 34, 911-20.
6. Noda I, Ozaki Y. Principle of two-dimensional correlation spectroscopy. In *Two-dimensional Correlation Spectroscopy. Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy*, John Wiley 2004.
7. Ortiz M, Sanoguel Z, Hu HT, *et al.* Dynamics of hydrogen - Deuterium exchange in Chlamydomonas centrin. *Biochemistry* 2005; 44, 2409-18.
8. Carmona P, Molina M. Interactions of protein and nucleic acid components of hepatitis C virus as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 2010; 49: 4724-31.
9. Pivonka D. Vibrational analysis of structure activity relationships (SAR) in molecular binding. *Appl. Spectrosc.* 2004; 58: 323-31.
10. Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quart Rev Biophys* 2002; 35: 369-430.
11. Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem* 1986; 38: 181-363.
12. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: Markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18: 1791-1800.
13. Song F, Poljak A, Smythe GA, *et al.* Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 2009; 61; 69-80.
14. Socrates G. Hydroxyl group compounds: O-H group. In *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. Socrates G (ed), John Willey, England, 2001: pp. 94-100.
15. Tuma R. Raman spectroscopy of proteins: From peptides to large assemblies. *J. Raman Spectrosc.*

- 2005; 36: 307-19.
16. Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994; 17: 489-517.
 17. Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, *et al.* Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 32916-22.
 18. Maler JM, Klafki HW, Paul S, *et al.* Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: evidence for novel Abeta species. *Proteomics* 2007; 7: 3815-20.
 19. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004; 89: 807-11.
 20. Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, *et al.* Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 96-103.
 21. Liao P, Yu L, Kuo CC, *et al.* Proteomics analysis of plasma for potential biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics. Clinical Applications* 2007; 1: 506-12.
 22. Yu HL, Chertkow HM, Bergman H, *et al.* Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma. *Proteomics* 2003; 3: 2240-48.
 23. Akiyama H, Barger S, Barnum, S, *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2001; 21: 383-421.
 24. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, *et al.* Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2000; 887: 80-9.
 25. Frank RA, Galasko D, Hampel H, *et al.* Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. *Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging* 2003; 24: 521-36.



Superoxide Dismutase: a therapeutic candidate for oxidative stress

Title in Spanish: *Superóxido Dismutasa: un candidato terapéutico para el estrés oxidativo*

Mario Riera Romo¹

¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana, calle 25, entre I y J, # 455. CP. 10400, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba

ABSTRACT: The Superoxide Dismutase activity is present in every cell with aerobic metabolism, and is just absent in obligate anaerobes, due to the important role that it plays in antioxidant protection of many cellular components from oxygen reactive species (ROS). Its deficit is related with different pathologies, such as inflammation, diabetes, cancer, neurodegenerative disorders, among others. In the present review, some pathologies produced by the enzymatic deficit will be tackled, and also the main methods of protein engineering, applied to optimization and modification of the enzyme as a therapeutic product.

RESUMEN: La actividad Superóxido Dismutasa está presente en toda célula de metabolismo aerobio y sólo ausente en microorganismos anaerobios obligados, pues cumple un importante rol en la protección antioxidante de numerosos componentes celulares, frente a las especies reactivas del oxígeno (ERO). Su afectación se relaciona con diversas patologías, entre las cuales se encuentran, la inflamación, la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y otras. En la presente revisión serán abordadas algunas de las patologías producidas por déficit de la enzima, así como las principales técnicas de ingeniería de proteínas aplicadas a la modificación y optimización de la misma como producto terapéutico.

*Corresponding Author: mayito265@gmail.com

Received: February 13, 2015 Accepted: April 5, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 1 (2015), pp. 25-36

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La Superóxido Dismutasa humana (hSOD) es una metaloenzima que presenta tres isoformas: hSOD1, hSOD2 y hSOD3. La hSOD1 pertenece a la familia de las Superóxido Dismutasas Cu/Zn (1), contiene 155 aminoácidos y actúa en forma de homodímero (**Figura 1**) que se mantiene estabilizado por entrecruzamientos del triptófano 33, residuo de dimerización (2). Posee dos átomos de cobre en su centro activo, los cuales forman enlaces de coordinación con las histidinas 47, 49, 64 y 121 de cada subunidad, funcionando como aceptores de electrones que le permiten a la enzima catalizar la dismutación de los aniones superóxido producidos como resultado del metabolismo oxidativo celular (3) mediante la siguiente reacción: $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Contiene también iones zinc en su estructura, a nivel de las histidinas 72 y 81, y del aspártico 84, los cuales aportan estabilidad estructural y favorecen la dimerización (4).

Se encuentra principalmente localizada en citoplasma y núcleo donde protege al material genético y a la mayoría de los orgánulos subcelulares, del estrés oxidativo (5). En estas localizaciones puede sufrir modificaciones postraduccionales que regulan su actividad y vida media, tales como la poliubiquitinación, que media su degradación proteosómica, así como la dimerización por entrecruzamiento de triptófano que impide la dimerización

por puente disulfuro, la cual regula negativamente a la enzima. Ésta también puede ser palmitoilada, lo cual promueve la residencia en núcleo pero disminuye la actividad, y succinilada en residuos adyacentes al centro catalítico rico en cobre, lo que igualmente disminuye la actividad. La succinilación es reversible y puede ser eliminada por la proteína SIRT5 (6).

Entre las principales funciones en las que esta isoforma participa se encuentran la activación de la vía de señalización de las MAP Quinasas, el transporte axónico, la fragmentación del DNA apoptótico, la organización celular estereociliada de los receptores auditivos, la coagulación sanguínea, el envejecimiento celular, el metabolismo del hierro, la contracción del músculo cardíaco, el procesamiento del glutatión, la homeostasis neuronal y muscular, la respuesta celular a múltiples drogas, la diferenciación de los linfocitos T en el timo, el desarrollo folicular del ovario, el desarrollo embrionario y de la placenta, entre otras (7, 8).

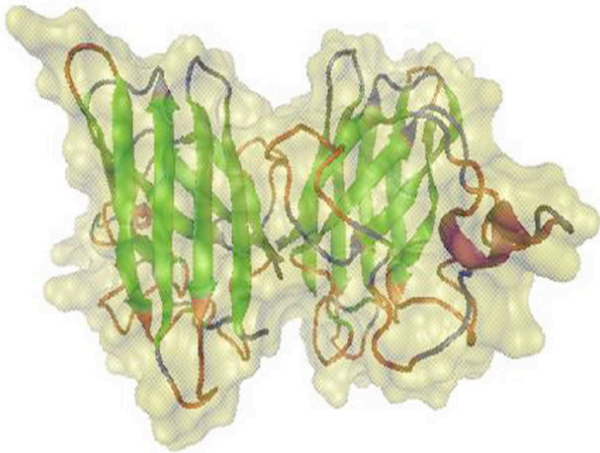


Figura 1. Estructura dímérica de la Superóxido Dismutasa 1 humana (hSOD1) obtenida mediante modelación por comparación. Se representa en verde la estructura en hoja β , en púrpura los motivos en hélice α , en rojo los giros, en azul los lazos y en amarillo la superficie total del dímero.

La hSOD2 pertenece a la familia de las Superóxido Dismutasas Fe/Mn y cataliza la misma reacción de dismutación que la hSOD1 (9). Posee 244 aminoácidos y actúa en forma de homotetrámero (**Figura 2**), que presenta un átomo de manganeso por subunidad, el cual es responsable de la dismutación y se encuentra coordinado en las histidinas 50, 98 y 187 y el aspártico 183 (10). La enzima se localiza fundamentalmente en la matriz mitocondrial, asociada a la dismutación inmediata de los aniones superóxido que allí se producen, la protección del propio organelo y el DNA mitocondrial contra la peroxidación, y la regulación de la apoptosis vía mitocondria y citocromo C (11).

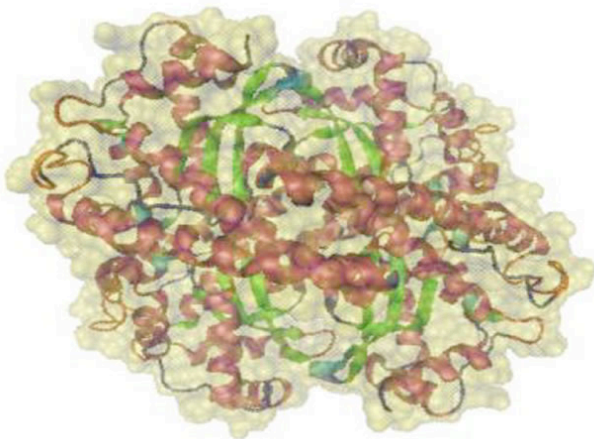


Figura 2. Estructura tetramérica de la Superóxido Dismutasa 2 humana (hSOD2) obtenida mediante modelación por comparación. Se representa en verde la estructura en hoja β , en púrpura los motivos en hélice α , en cian las hélices π , en rojo los giros, en azul los lazos y en amarillo la superficie total del tetrámero.

Su expresión es inducida por la proteína KRIT1 (12) y entre las principales modificaciones postraduccionales que experimenta, se encuentran, la nitración de la tirosina 58,

lo que regula negativamente la actividad (13), la acetilación de las lisinas 68, 122 y 202, lo que disminuye la actividad enzimática. Dicha modificación puede ser revertida por la desacetilasa SIRT3 (11). Esta isoforma mitocondrial de la hSOD, está involucrada en la respuesta a múltiples drogas, la hematopoyesis, la diferenciación celular, la homeostasia del O_2 , las vías de señalización de la apoptosis, el desarrollo del sistema renal, el mecanismo de la locomoción, la regulación de la presión sanguínea, entre otras múltiples funciones (14).

La tercera isoforma, hSOD3, pertenece a la familia de las Dismutasas Cu/Zn, y posee 240 aminoácidos (15). Actúa como homotetrámero (**Figura 3**), que contiene dos puentes disulfuro, entre la cisteína 63 y la 208 y entre la 125 y la 207, un ion cobre por subunidad, coordinado en las histidinas 114, 116, 131 y 181, y un ion zinc a nivel de las histidinas 139 y 142, y del aspártico 145 (16). La principal modificación postraduccionales de la enzima es la glicosilación de la asparagina 107 y las lisinas 229 y 230 (17).

Las funciones en las que esta isoforma participa aún no están del todo claras, pero se sabe que es secretada al líquido intersticial y se une con alta afinidad a heparina y heparán sulfato, expuestos en los tejidos, por lo que debe estar involucrada en la protección contra el estrés oxidativo en estas localizaciones.

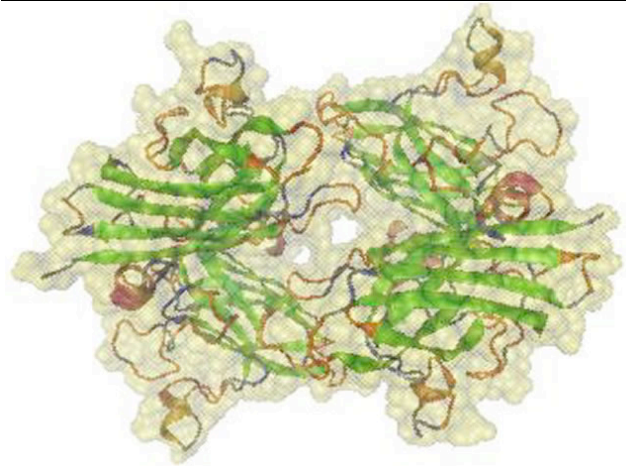


Figura 3. Estructura tetramérica de la Superóxido Dismutasa 3 humana (hSOD3) obtenida mediante modelación por comparación. Se representa en verde la estructura en hoja β , en púrpura los motivos en hélice α , en naranja las hélices $3-\pi$, en rojo los giros, en azul los lazos y en amarillo la superficie total del tetrámero.

1.1. Actividad SOD en la diabetes mellitus tipo I

Entre las causas no autoinmunes encontradas para la Diabetes Mellitus tipo I se ha propuesto el desbalance oxidativo y la peroxidación causada por ERO, la cual provoca la destrucción de las células β del páncreas y la consecuente disminución de los niveles de insulina, asociados a este trastorno metabólico. Esta hipótesis explica la patología y algunas de sus principales complicaciones mediante un déficit en los mecanismos protectores contra el estrés oxidativo, tales como la

actividad SOD (18).

La inactivación por glucosa de la SOD1 extracelular, el desbalance de la relación NADH/NAD⁺ (pseudohipoxia hiperglicémica) (19) y la desregulación del metabolismo de los cofactores requeridos por la hSOD1, 2 y 3 (Cu²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺) parecen ser las principales causas (20, 21).

Experimentos en modelos murinos para la enfermedad han demostrado una disminución de la actividad SOD en páncreas, hígado, riñón, cerebro, músculo y bazo (19), así como un decremento de la actividad SOD1 en eritrocitos y de la SOD2 en mitocondrias hepáticas de rata (20).

1.2. Papel de la SOD en el cáncer

La célula tumoral en su proceso de transformación maligna, inhibe y evade numerosos mecanismos de control, como la inducción de la apoptosis, el arresto de algunas fases del ciclo celular o el acortamiento de los telómeros, mientras sobreexpresa moléculas y activa mecanismos que le permiten la autosuficiencia para factores de crecimiento, la proliferación descontrolada y la supervivencia celular, tales como el receptor del EGF, el factor de transcripción NF-κB o la propia enzima hSOD, que protege a la célula cancerígena de la peroxidación causada por su propio metabolismo incrementado y no regulado (22).

Estudios realizados *in vitro*, en líneas tumorales de fibroblastos de pulmón humano, revelan incrementos en la actividad hSOD1 y 2 respecto a células normales (23). Por otra parte, investigaciones en hepatomas y tumores ascíticos de Ehrlich demostraron elevada actividad SOD2, comparando con tejido hepático sano (24), al igual que las mediciones de la actividad SOD en la leucemia linfocítica, monocítica y mielocítica, las cuales corroboran niveles mayores de esta actividad enzimática respecto a células sanguíneas maduras sanas, del mismo tipo (25).

De forma contradictoria, estudios realizados en Adenocarcinoma Pancreático encontraron una disminución de los niveles de expresión y la actividad hSOD2, y asocian este hecho al papel mutagénico atribuido a las ERO (26).

Algunos hallazgos más recientes evidencian el incremento de la actividad hSOD1 en células de cáncer de pulmón humano y la relacionan con la proteína pleiotrópica COMMD1, demostrando que células “knockdown” para esta proteína exhiben mayores niveles de la actividad antioxidante (27).

1.3. SOD y los desórdenes neurodegenerativos

Las llamadas Enfermedades o Trastornos Neurodegenerativos se caracterizan por apoptosis no regulada y muerte neuronal masiva en determinadas áreas del cerebro, por la influencia de múltiples factores cuyo papel no está del todo claro, lo que conduce a una pérdida de funciones neuromotoras y psíquicas comprendidas dentro de un conjunto de patologías como la Enfermedad de Alzheimer (EA), el Parkinson (P), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Enfermedad de Huntington (EH) y otras. Dentro de estos factores causales se ha considerado

la apoptosis por peroxidación lipídica y proteica y la apoptosis vía citocromo C, como algunas de las más probables, lo que implicaría una afectación en la actividad hSOD1 y 2 (28).

Estudios *in vitro*, en neuronas en cultivo, han demostrado que la inducción de la expresión de hSOD1 derivada de eritrocitos, impide o retarda la apoptosis causada por depleción del factor de crecimiento del nervio (NGF) (29), así como también experimentos realizados con muestras de pacientes y en algunos modelos murinos, correlacionan bajos niveles de SOD2 con pérdida de neuronas y muerte de células linfoblastoides, lo que provoca Ataxia Espinocerebelar tipo 3. La patología se caracteriza por mutaciones en el gen ATXN3, que conllevan a la pérdida de afinidad por el factor de transcripción FOXO4, afectándose el mecanismo de inducción de SOD2 ante estrés oxidativo (30).

Adicionalmente, se ha demostrado la relación entre la SOD1 y la ELA en modelos murinos (31). La patología se origina por apoptosis motoneuronal y se ha identificado como uno de los factores causales se ha debida a la activación de la quinasa MST1 por ERO, lo que resulta en un incremento en la actividad de p38 y una inducción de autofagia mitogénica dependiente de quinasas en las neuronas motoras (31).

2. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LA SOD

Las variadas patologías en las que la enzima está involucrada la convierten en objeto de estudio de numerosas investigaciones, con el objetivo de comprender las causas y complicaciones de algunas enfermedades multisistémicas asociadas al estrés oxidativo, así como mejorar racionalmente la estabilidad y actividad de la enzima con vistas a emplearla como producto terapéutico recombinante, de administración exógena. En el presente trabajo se realiza una revisión de las principales técnicas de ingeniería de proteínas aplicadas al análisis estructura-función y a la optimización funcional de la SOD.

2.1. Mutagénesis dirigida

Una de las líneas de investigación relacionada con experimentos de mutagénesis dirigida en la SOD, está basada en la obtención de mutantes para determinados residuos clave o la introducción de secuencias completas de otras variantes enzimáticas como la SOD extracelular (SOD3), para dilucidar elementos del mecanismo de acción de la enzima en condiciones fisiológicas.

Dentro de esta línea se encuentra el trabajo de Castellano I. et al. en 2009 (32), que expresa en *E.coli*, la SOD2 mitocondrial de rata, que posee un 93 % de identidad con la hSOD, y evalúa el comportamiento de cinco mutantes. En dos de ellos, Y34F-Q y Y34F-H, se reemplazó la tirosina 34 por fenilalanina y sólo diferían en la posición 143, ocupada por glutamina e histidina, respectivamente. Otros dos mutantes, S82A-Q y S82A-H, contenían alanina en la posición 82 en lugar de serina, e igualmente diferían en la posición 143, con glutamina e

histidina, respectivamente. El quinto mutante, H143, sólo presentaba una histidina en lugar de la glutamina 143.

La variante salvaje, que contiene glutamina en la posición 143, y los mutantes, no presentaron diferencias en sus patrones electroforéticos, sus perfiles cromatográficos en condiciones desnaturalizantes, ni en los análisis realizados por espectrometría de masas.

Sin embargo, la actividad específica fue mayor para la enzima nativa, mientras el mutante H143 tuvo la menor actividad, que representó el 16 % de la determinada para la variante salvaje. Los mutantes simples Y34F-Q y S82A-Q retuvieron un 67 y un 81 % de la actividad y los dobles mutantes Y34F-H y S82A-H, presentaron un nivel de actividad específica similar a H143. Estos resultados sugieren que este residuo de glutamina es importante para la catálisis, al parecer para la fijación o estabilización de algún intermediario formado, pues no participa directamente en el mecanismo sino que influye en el microambiente del centro activo. Los residuos tirosina 34 y serina 82 no tienen un papel decisivo en este proceso.

También fue evaluada la resistencia a la temperatura de todas las especies enzimáticas, obteniendo la curva de inactivación y calculando el factor entrópico y entálpico de cada variante. En todos los casos la inactivación siguió una cinética de primer orden, con una temperatura de inactivación media de 80 °C, que no varió significativamente para los mutantes (79 °C, 81 °C), lo que evidencia que dichas sustituciones no afectan la alta resistencia a la temperatura de la enzima nativa, aunque H143 presentó el menor valor de factor entálpico y la menor temperatura de inactivación media que fue de 77 °C. De este experimento puede concluirse que la glutamina 143 también influye en la alta resistencia de la enzima a la inactivación por calor, al parecer por la estabilización de la conformación. Una tirosina en esa posición aumenta ligeramente la inactivación y una serina la disminuye, pues parece influir de forma positiva, en el establecimiento de una nueva conformación resistente a la temperatura (32).

Igualmente se verificó la influencia de estos residuos en la fosforilación de la enzima, principal mecanismo de regulación de la misma. Por reacción con quinasas *in vitro*, se identificó la serina 82 como blanco de esta modificación, pues no se detectan especies fosforiladas del mutante S82A-Q, sólo de la enzima nativa. Esta modificación de la serina 82 podría constituir un blanco de regulación importante, debido al grado de conservación que posee en otras SOD (32).

Otro aporte importante y reciente en este campo es realizado por Candas D. et al. en 2013 (33), quienes obtienen un mutante de la SOD2 denominado S106A, en el cual replazan la serina 106 por alanina para evaluar el papel de dicho residuo en el reconocimiento por el complejo CyclinB1/Cdk1. Esta investigación toma como antecedentes algunos estudios de caracterización de la Cdk1, donde se han identificado determinados residuos de serina que constituyen sitios de fosforilación dentro de una secuencia consenso, en numerosas proteínas citosólicas que Cdk1 reconoce a nivel de dicha secuencia, mediante la

cual ejerce su regulación por fosforilación, implicada en múltiples procesos celulares (34, 35).

Análisis de estructura-función del mutante S106A, muestran como principales resultados la reducción de la actividad SOD2 en células murinas de músculo esquelético y cardíaco, extraídas de animales irradiados y transfectadas con S106A, respecto células control de los propios animales sometidos al mismo tratamiento, pero que expresan la SOD2 nativa, en las cuales la actividad representó el doble. También logran correlacionar dicha disminución con la inhibición de la fosforilación, mediante ensayos de detección de SOD2 fosforilada, por Western Blott, los cuales revelaron una disminución de la especie fosforilada de la enzima en las células transfectadas. Estos hallazgos en su conjunto, sugieren que la sustitución de la serina 106 por alanina en la SOD2 afecta el reconocimiento y la fosforilación por Cdk1, lo que disminuye la actividad enzimática, debido a que este residuo es requerido para la activación por modificación covalente de la SOD2 mediada por el complejo CyclinB1/Cdk1 (33).

Igualmente se han realizado investigaciones basadas en la obtención de quimeras entre isoformas de la SOD (36), que han permitido evaluar su función y dilucidar elementos estructurales de la SOD3 o SOD extracelular, entre los que se encuentran la demostración de la forma tetramérica activa para la SOD3 y su afinidad por heparina y heparán sulfato.

Estos investigadores logran expresar y purificar con un alto rendimiento, un mutante de la hSOD1 y la quimera hSOD1/3 (PseudoEC-SOD). El doble mutante monomérico de hSOD1, F50E/G51E, presenta una reducción de la actividad específica en un 90 % respecto a la enzima nativa, lo que demuestra la importancia de la fenilalanina 50 y la glicina 51 para la actividad de la hSOD1, las cuales a diferencia de las histidinas, no están directamente involucradas en el mecanismo catalítico sino que se encuentran expuestas en la interfaz de contacto entre monómeros de hSOD1.

Este experimento permite también determinar que el dímero está estabilizado por fuerzas hidrofóbicas y de van der Waals, pues la introducción de ácido glutámico, que es polar y cargado, en la interfaz de dimerización (en el doble mutante) reduce la actividad específica.

Dicho resultado se repite para la quimera triple mutante de PseudoEC-SOD, V24D/F50E/G51E, con la cual se confirma el papel de los residuos de fenilalanina y glicina en este caso para la heterodimerización, y además se comprueba que la sustitución de un aminoácido apolar alifático como la valina por uno polar con carga negativa como el ácido aspártico, reduce drásticamente la actividad catalítica, pues afecta la heterodimerización requerida para la dismutación de aniones superóxido (36).

También se ha estudiado el plegamiento específico del monómero de la enzima, el grado de exposición de ciertos residuos y cómo influyen sobre los mismos diferentes factores, empleando una técnica novedosa basada en la introducción de aminoácidos fluorescentes obtenidos por

síntesis química, como la dansilalanina [ácido 2-amino-3 (5 (dimetilamino) naftaleno-1 sulfonamida) propanoico].

Dicha técnica se empleó con éxito para marcar la hSOD1 (37), para lo cual se transformaron por mutagénesis dirigida, los codones para la glutamina 16 y el triptófano 33 en codones de alanina, para luego incorporar en esas posiciones la dansilalanina y poder estudiar la conformación del plegamiento y la orientación de dichos residuos en el mismo.

Sin embargo la incorporación de un amino ácido no natural a una proteína es un procedimiento complejo, que requirió en este caso, del empleo de un RNA de transferencia y su Aminoacil-tRNA Sintetasa, (tRNA^{Leu5/LeuRS}) provenientes de una cepa de *E. coli*, supresora de tRNA/ leucil-tRNA, para expresarlos en levadura, donde constituyen proteínas ortogonales que no reaccionan con las Aminoacil-tRNA Sintetasas ni con los tRNA endógenos. Luego fue necesario generar una biblioteca de mutantes para Leucil-tRNA Sintetasa, en residuos del centro activo y del sitio editor, con el objetivo de modificar la especificidad de esta enzima por la leucina y lograr que incorporara la dansilalanina.

Una vez ingenierizado este sistema de incorporación, los investigadores introdujeron la secuencia de la hSOD1 con cada mutación (Q16A y W33A) en la cadena SCY4 de levadura, y pudieron obtener proteínas fluorescentes con un alto rendimiento. El estudio de desplegamiento y renaturalización las hSOD mutantes a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio, permitió determinar que los residuos 16 y 33 se encuentran ocluidos en el interior de la enzima nativa, interactuando con el núcleo de hoja β y que el triptófano 33 es altamente afectado por algunos factores desnaturalizantes, como la presencia de un agente caotrópico, por lo que constituye un residuo implicado en la estabilidad del monómero (37).

Otros aspectos de interés, como la capacidad de dimerización y el rol del triptófano 33 en este proceso, no pudieron ser evaluados por el empleo del agente caotrópico, sin embargo sería relevante estudiar la conformación del dímero empleando esta técnica de fluorescencia, pero en condiciones no desnaturalizantes.

Una segunda línea de investigación sobre mutagénesis dirigida aplicada a la SOD, se ha encaminado a obtener mutantes típicos que se relacionan con determinadas patologías, para evaluar en modelos animales de estas enfermedades el papel de la SOD en la génesis y agravamiento de las mismas.

En este sentido, son de gran importancia los resultados obtenidos por Gurney M. et al. en 1994 (38) y Banci L. et al. en 2008 (39), quienes demuestran la expresión de los mutantes de hSOD1, G93A y G94A, en la ELA. Estos resultados confirman la presencia de agregados fibrilares y no funcionales de hSOD1, lo que evidencia la relación entre la introducción de glicina en las posiciones 93 y 94, y la tendencia a la agregación, en la cual los puentes de hidrógeno juegan un papel decisivo.

Sobre esta temática, algunas investigaciones más

recientes correlacionan la expresión del mutante SOD1-G93A en modelos murinos, con la activación de la quinasa MST1 por especies reactivas del oxígeno, que se acumulan debido la deficiencia de la actividad SOD1 provocada por la agregación fibrilar (31). Los resultados obtenidos muestran una elevada actividad MST1 en motoneuronas en cultivo y en modelos de ratón y rata, en los que se ha inducido la expresión de la SOD1 mutante.

También permiten caracterizar el mecanismo de inducción de la apoptosis por MST1, el cual se identifica como una autofagia mitogénica que depende de la activación de la proteína p38, la vía de las MAP Quinasas y las Caspasas (31).

Por otra parte, lo planteado por Seiffers R. et al. en el 2013 (40), sugiere que el factor de transcripción ATF3 tiene un efecto neuroprotector y antiapoptótico en modelos murinos para SOD1-G93A, lo que está mediado por regeneración axónica y muscular, que contribuye a minimizar los efectos de peroxidación y pérdida de estructuras celulares, causados por la afectación en la actividad SOD1. Estos estudios aportan conocimientos de vital importancia en el establecimiento de una terapia para la ELA.

2.2. Modificaciones químicas

Aunque los estudios de mutagénesis dirigida han tenido el protagonismo en los análisis de estructura-función de la hSOD, la modificación química de residuos ha contribuido a la comprensión del funcionamiento de la enzima en determinadas condiciones fisiológicas, así como la evaluación de la influencia de las modificaciones naturales que ésta puede sufrir, sobre su funcionamiento.

Weisiger R. y Fridovich I. en 1973 (41), realizaron varias modificaciones que contribuyeron a la caracterización de las dos principales isoformas de la SOD aislada de hígado de pollo, y muchos de sus hallazgos han sido demostrados para las isoformas de la hSOD. Estas modificaciones comprenden el tratamiento con cianuro, β -mercaptoetanol, dimetilsulfóxido, p-cloromercurifenil sulfonato, la hidrólisis ácida total con HCl a una concentración de 6 M y la oxidación con ácido perbórmico.

El cianuro inhibe la transferencia de electrones a nivel de los átomos de cobre del centro activo en la SOD1, pero no tiene efecto sobre la SOD2 debido que el sitio activo presenta manganeso. Este tratamiento químico permitió diferenciar las dos isoformas, citosólica y mitocondrial, de la SOD y confirmar la composición de cobre y manganeso de cada enzima, que ya había sido encontrada en otras SOD de bacterias y de plantas. Por su parte, el β -mercaptoetanol, un agente reductor fuerte, fue de gran utilidad en el estudio de las subunidades de la enzima, junto con el detergente aniónico Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, por sus siglas en inglés), siendo este trabajo uno de los primeros en plantear la estructura dimerica para SOD1 y la tetramérica para SOD2. También evidenció que la dimerización de SOD1 y SOD2 no ocurría por puentes disulfuro, sólo en condiciones muy oxidantes del medio y conllevaban a agregados multienzimáticos no activos,

aunque en SOD2 si se formaban puentes disulfuro intracatenarios (41).

La hidrólisis total con HCl fue empleada para el análisis de la composición aminoacídica de la SOD1 y la SOD2, donde además se empleó para la SOD1, el tratamiento con dimetilsulfóxido y la oxidación con ácido per fórmico, para identificar las cisteínas presentes en dicha isoforma. La identificación de grupos sulfidrilos por subunidad, fue realizada con p-cloromercurifenil sulfonato y arrojó como resultado 1,2 grupos por subunidad, lo que se reducía a 0,3 grupos en la enzima autooxidada y mantenida en una solución de fosfato de potasio a 0,05 M y EDTA, pH=7,8 por 2 semanas. Este resultado indica que la autooxidación de la SOD1 disminuye su reactividad, en términos de grupos sulfidrilos accesibles a un modificador químico (41).

Por otra parte, han sido evaluados algunos factores que influyen sobre la catálisis de la SOD1 de eritrocitos bovinos, tales como la oxidación (42). La inhibición de la SOD1 por su producto, H_2O_2 , fue examinada en términos de la oxidación de la histidina 118, ubicada en el centro catalítico, lo que redujo significativamente la actividad. El residuo oxidado en forma de 2-oxo-histidina, pudo ser detectado por hidrólisis ácida y análisis de la composición aminoacídica de la SOD1 por RP-HPLC, que después se identificó en la posición 118 por mapeo tríptico y análisis peptídico por RP-HPLC. El estudio de modificación selectiva de histidina con H_2O_2 , demostró la importancia de este residuo en el mecanismo catalítico de la enzima y su implicación en la inactivación por producto.

Una de las mayores aplicaciones de la modificación química en la SOD, constituye el mejoramiento de la enzima para su uso terapéutico, que se propone extender el tiempo de vida media en sangre, minimizar la inactivación y mejorar la estabilidad en condiciones fisiológicas.

Sobre este tema tratan los trabajos de Veronese F. et al. en 1985 (43), que describen un método factible para la obtención de conjugados de monometoxi-polietilen glicol con proteínas y péptidos, empleando derivados fenilcarbonados de polietilen glicol (PEG). Estos derivados altamente reactivos, pueden lograrse mediante reacción con 2,4,5-tricloro-fenilcloroformiato o p-nitrofenilcloroformiato.

Empleando dicho procedimiento, obtienen un derivado SOD1-PEG que posee mayor tiempo de retención en sangre en ratas a las cuales les fue administrado por vía endovenosa, respecto a la SOD1 nativa, la cual es aclarada rápidamente por los riñones y detectada en la orina de los animales. La conjugación con polímeros aumenta el radio de la molécula, lo que disminuye su aclaramiento por filtración en el glomérulo renal y además preserva frente a la acción de proteasas (43).

La enzima modificada es menos inmunogénica y es reconocida con baja afinidad por anticuerpos específicos, debido a que el PEG modifica múltiples grupos amino en la proteína, por lo que logra bloquear epítopos que afectan el reconocimiento. Esto puede constituir una ventaja si se desea administrar enzimas no humanizadas o en forma

quimérica directamente en la sangre, con poco rechazo inmunológico. También se evaluó la actividad del derivado, la cual no varió significativamente del control no modificado, evidenciando que la conjugación no afecta los residuos del centro activo ni la conformación nativa (43).

La modificación con PEG o pegilación como herramienta para mejorar las propiedades de las isoformas de la SOD, ha sido también aplicada en la optimización de una terapia experimental en modelos de rata para la Isquemia Cerebral (44). La inyección intravenosa de 10,000 U/kg de PEG-SOD disminuye el volumen de infarto a 139 +/- 9 mm³, respecto a un control tratado con placebo, en el cual fue de 182 +/- 8 mm³, resultados que fueron determinados para un total de 38 individuos.

Estos resultados confirman el efecto protector y de estabilidad conferido al PEG, y constituyen más hallazgos que relacionan la SOD con enfermedades inflamatorias y lesiones tisulares.

Un enfoque interesante sobre la misma aplicación, es planteado por Fujita T. et al. en 1992 (45), donde exponen cómo es posible mejorar la estabilidad en plasma de la SOD humana recombinante (hSODr) y dirigir su acción a tejidos específicos, empleando la conjugación con polisacáridos y monosacáridos. Mediante la síntesis de cuatro derivados diferentes, hSOD-carboximetil dextrano, hSOD-dietilaminoetil dextrano, hSOD galactosilada y hSOD manosilada, evaluaron el tiempo de vida en plasma y la distribución de los productos modificados por farmacocinética en modelo de ratón, así como la actividad de los conjugados.

Los derivados obtenidos retuvieron de un 50 a un 80 % de la actividad enzimática original y fueron estables en una incubación con suero de ratón, manteniendo un 80 % de la actividad por 3 horas, lo que indica que la modificación no afecta la actividad y los conjugados no son neutralizados por anticuerpos murinos. La administración por vía intravenosa de la hSODr nativa conllevó a una rápida eliminación por vía renal, siendo detectada en alta concentración en la orina, mientras la hSOD-carboximetil dextrano presentó un elevado tiempo de vida media en plasma, debido a la no filtración glomerular y a la interacción con los tejidos. Las formas galactosilada y manosilada de la hSOD fueron incorporadas en poco tiempo a las células parenquimatosas y no parenquimatosas del hígado, por endocitosis mediada por receptor. La cinética de este aclaramiento hepático presentó un comportamiento no lineal, disminuyendo con incrementos en la dosis, con un valor máximo a la dosis mínima de 0.1 mg/kg (45).

Por otra parte, la hSOD-dietilaminoetil dextrano se acumuló rápidamente en hígado, pero esta retención fue de tipo electrostático y constituye un mecanismo de captación menos específico (45).

En conjunto, estos resultados validan la modificación con compuestos mono y polisacáridos, no sólo en el mejoramiento de la estabilidad y el tiempo de vida media en plasma de la hSODr, sino en su biodistribución. Esta aplicación aporta ventajas claras para las terapias basadas

en la administración exógena de hSOD, la cual requiere la acción selectiva de la enzima en las lesiones tisulares y zonas localizadas de inflamación.

En este campo también se ha probado la modificación de la SOD con otros polímeros, como el copolímero de éter divinilo y anhídrido maleico (DIVEMA, por sus siglas en inglés), lo que produce conjugados con buena retención de la actividad, que mostraron mayor tiempo de vida media y una captación incrementada en el hígado, en modelo de rata para edema pulmonar con reperusión bronquial. Dichos conjugados fueron capaces de reducir los procesos inflamatorios intrahepáticos, proteger contra el edema bronquial y evitar la infiltración leucocitaria en los vasos sanguíneos, lo que fue evaluado por microscopía electrónica (46).

De igual forma la conjugación de la SOD con la sal sódica del ácido hialurónico se ha logrado con éxito, empleando la modificación por enlaces amida entre los grupos amino de la proteína y los grupos carboxilo del ácido hialurónico, con el uso de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. (47). Los derivados resultantes retuvieron un 70 % de la actividad enzimática original y manifestaron un elevado efecto antiinflamatorio y no inmunogénico, en modelo de rata para edema de la pata inducido por la carragenina y para artritis adyuvante.

Otras estrategias, basadas en la conjugación de la hSOD1 a proteínas séricas por modificación de residuos, también han ofrecido buenos resultados, en términos del aumento del radio de la enzima y por tanto la reducción del aclaramiento renal y la eliminación en la orina (48). El conjugado entre la hSOD1 y la albúmina sérica se forma espontáneamente en sangre al suministrar la hSOD1 modificada en sus residuos de lisina con AMS [poli-(ácido maléico-co-estireno) butil éster].

La modificación química fue evaluada *in vitro*, por cromatografía de afinidad con una matriz de albúmina-sefara, que demostró retención específica de la AMS-hSOD1, mientras la hSOD1 nativa fue eluida en la fracción no fijada. La evaluación *in vivo* en modelos animales, reveló un incremento en el tiempo de vida media en plasma de la AMS-hSOD1, que fue de 6 horas, respecto a la enzima no modificada que fue eliminada por la orina en menos de 4 minutos. Adicionalmente, la medición de radicales libres plasma evidenció una disminución, respecto a los animales tratados con la hSOD1 nativa, lo que valida este producto modificado para la reducción de radicales libres circulantes (48).

Algunas investigaciones más recientes, demuestran la eficacia de la modificación de la SOD con polisacáridos iónicos tales como la carboximetil quitina, el manano (49) y la carboximetil celulosa (CMC) (50), siendo esta última modificación factible de realizar, por alquilación reductiva con el derivado polialdehídico de la CMC o con la carbodiimida como agente acoplante. Estos derivados polisacáridicos de SOD retuvieron una actividad mayor del 50 % y presentaron óptimos resultados farmacocinéticos en modelos de ratón y rata.

2.3. Inmovilización covalente

Debido a que la SOD cataliza una reacción muy específica, en la que el anión superóxido no puede ser remplazado por un sustrato sintético con vistas a obtener un producto para uso industrial o de interés biomédico, no ha existido un desarrollo marcado en el área de la biocatálisis y los bioprocesos, vinculado a esta enzima. Más bien la alta especificidad de la proteína y la generación de un producto (H_2O_2), detectable y cuantificable por técnicas espectrofotométricas, quimioluminiscentes y otras, ha propiciado que la principal aplicación de la inmovilización covalente de esta enzima, haya sido la obtención de biosensores para medir el estrés oxidativo y los radicales libres en sistemas biológicos.

Debido a esto, las principales propuestas de inmovilización de la SOD para aplicaciones concretas, han estado basadas en la fijación covalente, mediante reactivos bifuncionales tales como el glutaraldehído, a micropelículas formadas por ácidos orgánicos, polisacáridos, polímeros industriales u orgánicos, recubriendo superficies metálicas de electrodos de oro o platino, así como nanopartículas con diversas propiedades que constituyen la base de estos biosensores (Figura 4).

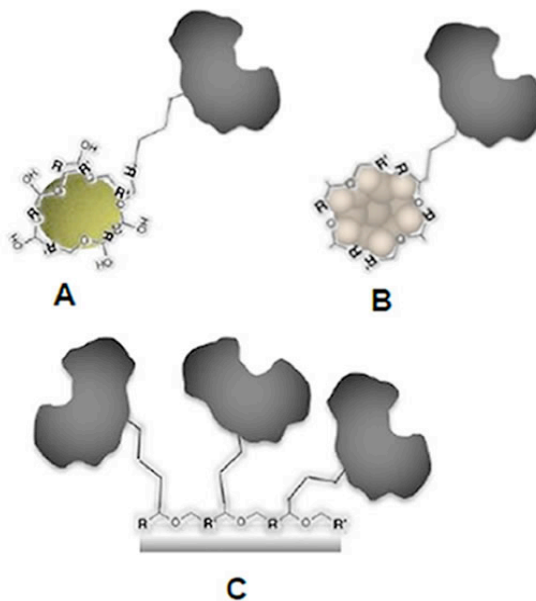


Figura 4. Principales configuraciones de inmovilización covalente, que se han empleado en el trabajo con la SOD. A) Sobre nanopartículas de oro recubiertas de polisacáridos o ácidos orgánicos. B) Sobre nanopartículas de óxidos metálicos modificadas con polímeros orgánicos. C) Sobre micropelículas poliméricas que recubren electrodos metálicos.

En 2001, Ge B. et al. (51), desarrollan un biosensor, inmovilizando la SOD1 de eritocitos bovinos en un electrodo de oro modificado con ácido 3-mercaptopropiónico (AMP) a partir de la 2-mercaptopetilamina (MEA) fijada al electrodo con un tratamiento extremo a base de ácido sulfúrico. El oro modificado puede incorporar la enzima, por reacción con

1-Etil-3(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC). Se obtuvo una repuesta electroquímica pronunciada y sostenida por parte de la SOD1 inmovilizada, con un potencial de 56 ± 9 mV, en tampón de baja fuerza iónica y libre de proteínas, a pH 7,5. Este resultado indica una transformación redox cuasirreversible, por parte de la enzima sobre la superficie de oro.

Aunque se constató cierta pérdida de actividad por parte de la proteína, se mantiene la sensibilidad necesaria para la función del biosensor. El empleo de un modificador de mayor longitud podría solucionar esta deficiencia, al permitir una mayor interacción proteína-electrodo (51).

Un acercamiento similar a esta aplicación es descrito por Endo K. et al. en 2002 (52), con la obtención de un biosensor a partir de SOD2 inmovilizada en un electrodo de platino con el empleo de glutaraldehído y un mediador para el transporte de electrones, compuesto por ferrocen-carboxaldehído, cianamida y albúmina bovina. El sistema completo fue recubierto con poliuretano como protección adicional.

Este biosensor se empleó para cuantificar aniones superóxido en solución, generados por la Xantina Oxidasa en presencia de xantina, mediante una corriente eléctrica, acoplado el electrodo a un sistema de detección. En las soluciones evaluadas la señal del sensor creció linealmente, de forma proporcional a las cantidades de xantina añadida, lo que evidencia la precisión de las mediciones. También se determinó la capacidad de detección del sensor a partir de tejido cardíaco de ratas inyectadas con endotoxina, resultando en una medición estable con valores elevados, en concordancia con la situación de estrés oxidativo generada (52).

En otras investigaciones se ha combinado la mutagénesis dirigida y la inmovilización, para lograr métodos factibles y eficientes de fijación covalente de la SOD1 a superficies de oro, con aplicación en la construcción de biosensores (53). En este trabajo se obtienen 6 mutantes monoméricos en los que se han introducido una o dos cisteínas adicionales, lo que permite inmovilizar la enzima mediante grupos sulfidrilos en una superficie de oro, sin necesidad de recubrimiento orgánico ni otros modificadores. Un biosensor obtenido por este principio fue evaluado en la determinación de radicales superóxido, mostrando una mayor sensibilidad que los electrodos de Citocromo C clásicos (53), sin interferencias, pero sin alcanzar la sensibilidad del sensor de oro modificado con AMP a partir del dímero de SOD1 inmovilizado.

La otra aplicación fundamental, de carácter más reciente en el campo de la inmovilización de la SOD, es la fijación a nanopartículas metálicas (**Figura 4, A y B**).

En este sentido destaca el trabajo de Villalonga R. et al. en 2005 (54), con la obtención de nanopartículas de oro perfoladas y recubiertas de β -ciclodextrina, que permiten la inmovilización supramolecular de la SOD1 con alta retención de la actividad. Este dispositivo tiene potencialidades para ser empleado en futuras terapias contra el estrés oxidativo.

También se han obtenido biosensores para radicales a partir de la SOD inmovilizada en nanopartículas de óxido de níquel, que a su vez se retienen por electrodeposición con voltametría cíclica en un electrodo de fibra de carbono modificado (55). El sensor obtenido por este método, mantiene un proceso redox bien definido con un potencial de $-0,03$ V en pH 7,4. La SOD inmovilizada presentó un recubrimiento superficial (I) y una constante de transferencia electrónica heterogénea (k_s) de $1,75 \times 10^{-11}$ mol/cm² y $7,5 \pm 0,5$ s⁻¹, respectivamente. En general, el biosensor exhibió una respuesta amperométrica muy rápida (3 s) en un rango de concentraciones de anión superóxido de 10 μ M a 0,25 mM, una alta sensibilidad ($12,40$ nA μ M⁻¹ cm⁻²) y un límite de detección de 2,66 μ M. Este dispositivo muestra elevada estabilidad, reproducibilidad y tiempo de vida (54), lo que valida las nanopartículas de óxidos metálicos como portadores eficientes de SOD inmovilizada, para determinaciones amperométricas de radicales sin interferencias.

Otra aplicación importante de la SOD en el campo de la nanotecnología, fue aportada por Song C. et al. en 2012 (55), que inmovilizan por medio de glutaraldehído, la SOD2 termoestable aislada del organismo *Thermus thermophilus*, en nanopartículas supermagnéticas de óxido de hierro y silicio modificadas con polímeros orgánicos.

Las partículas con la enzima incorporada fueron caracterizadas por difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y análisis magnetométrico. Se registró un diámetro de 40 ± 5 nm y un valor de saturación de magnetización de 27,9 emu/g, sin remanencia o coersitividad. En comparación con la enzima libre, la SOD2 inmovilizada presentó mayor resistencia a la temperatura, pH, iones metálicos, inhibidores enzimáticos y detergentes (55). Otros resultados mostraron que la enzima puede ser reutilizada 10 veces sin pérdida significativa en la actividad, lo que evidencia la factibilidad de este método de inmovilización y la estabilidad que brinda el anclaje químico a nanopartículas (55). Estos nanodispositivos ofrecen ventajas en la biomedicina y otras aplicaciones industriales basadas en la SOD2.

2.4. Atrapamiento y microencapsulación

La encapsulación en estructuras poliméricas y liposomas, así como el atrapamiento en geles y polímeros proteicos (**Figura 5**), también han encontrado su aplicación en el trabajo con la SOD, siendo empleados tanto para la obtención de biosensores como para el mejoramiento terapéutico y la liberación controlada de la enzima.

En algunos experimentos se ha realizado el atrapamiento de SOD y Xantina Oxidasa en matrices de gelatina entrecruzada con glutaraldehído (56), creando sistemas estables de porosidad controlada (**Figura 5A**) que permiten la difusión de sustratos y constituyen modelos para la generación y evaluación de radicales libres.

Campanella L. et al. en 1999 (57) obtuvieron un biosensor a partir de la SOD atrapada en geles de κ -

carrageno sobre electrodos indicadores, probando con electrodos de Clark y con electrodos amperométricos clásicos para H_2O_2 , resultando estos últimos, más efectivos. El biosensor fue evaluado in vitro con el sistema xantina/Xantina Oxidasa y permitió la caracterización de otras proteínas antioxidantes en cuanto a su efecto sobre el anión superóxido.

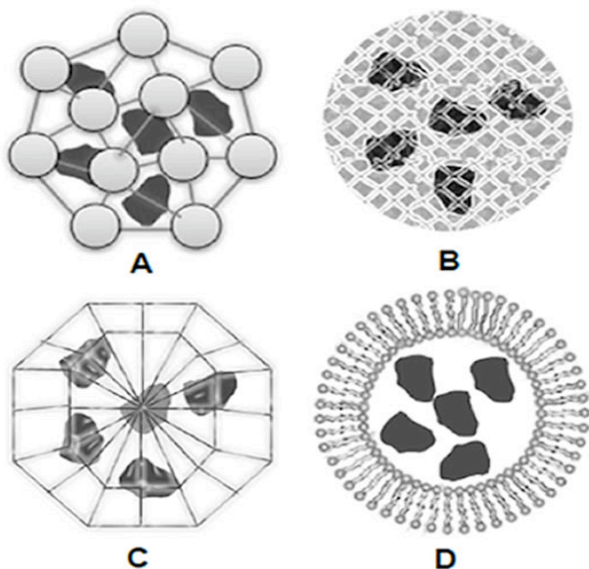


Figura 5. Representación esquemática de cuatro formas de inmovilización mediada por atrapamiento que se han empleado en la caracterización y optimización de la SOD. A) Atrapamiento en una red proteica entrecruzada con glutaraldehído. B) Atrapamiento en gel. C) Microencapsulación en cristal de sílica porosa. D) Encapsulación en liposomas.

Un acercamiento más actual a esta aplicación es descrito por Emregul E. en 2005 (58), quien logra un biosensor para aniones radicales, atrapando la SOD en gelatina reforzada por entrecruzamiento con glutaraldehído sobre la superficie de un electrodo de platino. El sensor fue evaluado en varias condiciones de pH y fuerza iónica, manteniendo una medición estable, proporcional a la concentración de O_2^- , con un límite de detección de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ y una relación señal/ruido de 3. El dispositivo retuvo de un 80 a un 60 % de su sensibilidad tras el uso por 4 semanas, demostrando que la gelatina brinda un microambiente estable y biocompatible con la SOD, que mantiene la actividad enzimática de forma eficiente (58). Algunas aplicaciones directas en las que este biosensor pudo ser probado, fueron la evaluación de la capacidad antioxidante de drogas derivadas de ácido acetilsalicílico y la determinación del estrés oxidativo en tejido cerebral tumoral y sano (58).

La microencapsulación ofrece también ventajas atractivas para el estudio de la SOD en microambientes controlados y para posibles aplicaciones terapéuticas. Un ejemplo lo constituye el atrapamiento de la SOD1 en microcápsulas de cristal de sílica porosa (**Figura 5C**), obtenido por el método sol-gel (59). Estas microcápsulas

se logran con condiciones poco drásticas, lo que permite el mantenimiento de una elevada actividad enzimática en su interior. Además son porosas lo que permite el intercambio de sustancias pero impide la pérdida de la enzima, y son transparentes, lo que facilita el seguimiento de las propiedades ópticas de las proteínas encapsuladas.

Por otra parte la encapsulación de la SOD en liposomas (**Figura 5D**) ha logrado mejorar la biodistribución y preservar la estabilidad, siendo efectiva como estrategia terapéutica. La SOD1 recombinante encapsulada en liposomas fue utilizada en el tratamiento de heridas por quemaduras (60), demostrando una reducción de las lesiones tisulares, el edema y la necrosis local, así como un incremento en la reepitelialización y la cicatrización en pacientes tratados, respecto a pacientes control que recibieron placebo.

Igualmente se ha constatado la efectividad de liposomas recubiertos de PEG como sistemas portadores de SOD1, que permiten su liberación controlada en sitios artríticos inflamados, en pacientes y modelos murinos de artritis reumatoide, mediando una disminución de la inflamación y del depósito de inmunocomplejos (61).

Otra aplicación referida a la encapsulación de la SOD en liposomas, es descrita por Pluta J. y Karolewicz B. en 2003 (62), que encapsulan la enzima en liposomas obtenidos a partir de lecitina de soya, estearilamina, fosfatidilglicerol y colesterol, recubiertos de quitosano, un polisacárido biocompatible de uso industrial y biomédico. Este recubrimiento funciona como mucoadhesivo por su alta hidratación, permitiendo al liposoma depositarse y liberar su contenido en las mucosas (62). Estos preparados han mostrado alta retención de la actividad SOD y ofrecen propiedades útiles, desde el punto de vista terapéutico para el tratamiento de inflamación y lesiones mucosales, así como para algunas hipersensibilidades que ocurren a nivel de las mucosas (62).

Una aplicación similar es lograda por Domínguez A. et al. en el 2004 (63), quienes logran un sistema de liberación controlada de la SOD, atrapándola en hidrogeles de CMC. Éste constituye uno de los primeros intentos de inmovilización por atrapamiento de la SOD en hidrogeles, para uso biomédico. Dicho sistema se logró por adición estequiométrica de 2-cloro-1-metilpiridin ioduro (CMP-I) a la solución de la enzima con CMC. El preparado retuvo la actividad enzimática de forma eficiente y mejoró las propiedades farmacológicas respecto a la enzima nativa (63). La cinética de liberación fue determinada, presentando una liberación de un 50 % a las 72 horas. Este sistema basado en hidrogeles de entrecruzamiento intermedio (54 %), promueve además la proliferación de fibroblastos humanos en cultivo, pues su estructura porosa y esponjosa provee un ambiente adecuado que actúa como soporte para las células adherentes, que no es muy reticulado o compacto, lo que permite el crecimiento (63).

Los resultados expuestos reafirman los sistemas de liberación controlada de SOD basados en hidrogeles, como herramientas útiles en la farmacología y la terapia, que disminuyen el estrés oxidativo y promueven la

proliferación de fibroblastos y la reparación tisular.

3. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Como se ha abordado en esta revisión, las principales técnicas de ingeniería de proteínas encaminadas al trabajo con las isoformas de la SOD, han permitido su caracterización, el análisis estructura-función y el desarrollo de algunas aplicaciones terapéuticas para afecciones relacionadas al estrés oxidativo. Se han evaluado las tres isoformas de esta proteína y se ha establecido, tanto su función biológica, como su implicación en determinadas patologías, por lo que las perspectivas de investigación actuales relacionadas con la SOD, están dirigidas al mejoramiento de la enzima para implementar terapias basadas en la administración exógena.

Las principales deficiencias de estas estrategias terapéuticas, radican en la baja estabilidad de la enzima, la imposibilidad de dirigirla a un blanco específico, la susceptibilidad a la inactivación y la proteólisis, y la rápida excreción por vía renal, que limita el tiempo de vida media en sangre. Algunas de las técnicas de modificación con polisacáridos, PEG y otros polímeros orgánicos, así como la microencapsulación y el atrapamiento, parecen resolver algunos de estos inconvenientes y en general elevan la permanencia en plasma y protegen contra la inactivación, la proteólisis y la neutralización por anticuerpos. Sin embargo la terapia basada en administración de SOD aún afronta retos, como el mejoramiento de la biodistribución y un mayor tiempo de vida media, que permita minimizar las dosis y emplear esta enzima como adyuvante para múltiples terapias combinadas, o como producto de uso tópico y sistémico, para variados trastornos isquémicos, vasculares, neurodegenerativos, autoinmunes e incluso el cáncer.

La combinación de sistemas de liberación controlada y modificación con sustancias biocompatibles, junto con las tecnologías de acoplamiento de anticuerpos o nanopartículas, ofrecen opciones atractivas y promisorias en cuanto a la ingeniería de esta proteína y la búsqueda de un producto antioxidante eficiente para uso clínico.

4. REFERENCIAS

1. Roberts, BR, Tainer, JA, Getzoff, ED, Malencik, DA, Anderson, SR, Bomben, VC. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J Mol Biol* 2007; 373: 877-890.
2. Medinas, DB, Gozzo, FC, Santos, LF, Iglesias, AH, Augusto, O. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1046-1053.
3. Enayat, ZE, Orrell, RW, Claus, A, Ludolph, A, Bachus, R, Brockmueller, J. Two novel mutations in the gene for copper zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1239-1240.
4. Banci, L, Benedetto, M, Bertini, I, del Conte, R, Piccioli, M, Viezzoli, MS. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 1998; 37: 11780-11791.
5. Marin, EP, Derakhshan, B, Lam, TT, Davalos, A, Sessa, WC. Endothelial cell palmitoylproteomic identifies novel lipid-modified targets and potential substrates for protein acyl transferases. *Circ Res* 2012; 110: 1336-1344.
6. Lin, ZF, Xu, HB, Wang, JY, Lin, Q, Ruan, Z, Liu, FB. SIRT5 desuccinylates y activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem. Biophys. Res Commun* 2013; 441: 191-195.
7. Kajihara, J, Enomoto, M, Nishijima, K, Yabuuchi, M, Katoh, K. Comparison of properties between human recombinant and placental copper-zinc SOD. *J Biochem* 1988; 104: 851-854.
8. Arnesano, F, Banci, L, Bertini, I, Martinelli, M, Furukawa, Y, O'Halloran, TV. The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J Biol Chem* 2004; 279: 47998-48003.
9. Barra, D, Schinina, M, Simmaco, M, Bannister, J, Bannister, W, Rotilio, G. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1984; 259: 12595-12601.
10. Perry, J, Herna, A, Cabelli, D, Nick, H, Tainer, J, Silverman, D. Contribution of human manganese superoxide dismutase tyrosine 34 to structure and catalysis. *Biochemistry* 2009; 48: 3417-3424.
11. Choudhary, C, Kumar, C, Gnad, F, Nielsen, M, Rehman, M, Walther, TC. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 2009; 325: 834-840.
12. Goitre, L, Balzac, F, Degani, S, Degan, P, Marchi, S, Pinton, P. KRIT1 regulates the homeostasis of intracellular reactive oxygen species. *Plos One* 2010; 5: 11786-11786.
13. Xu, S, Ying, J, Jiang, B, Guo, W, Adachi, T, Sharov, V. Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease y aging. *J Physiol* 2006; 290: 2220-2227.
14. Nomiyama, T, Tanaka, Y, Piao, L, Nagasaka, K, Sakai, K, Ogihara, T. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 2003; 48: 138-141.
15. Nozik-Grayck, E, Suliman, H, Piantadosi, C. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 246-247.
16. Antonyuk, S, Strange, R, Marklund, S, Hasnain, S. The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *J Mol Biol* 2009; 388: 310-326.

17. Liu, T, Qian, WJ, Gritsenko, MA, Camp, DG, Monroe, ME, Moore, RJ. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *Proteome Res* 2005; 4: 2070-2080.
18. Oberley, L. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 13-124.
19. Williamson, JR, Chang, K, Frangos, M. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993; 42: 801-813.
20. Szalczky, E, Prechl, J, Fehér, J, Somogyi, A. Alterations in enzymatic antioxidant defense in diabetes mellitus-a rational approach. *Postgrad Med J* 2000; 75: 13-17.
21. Tagami, S, Kondo, T, Yoshida, K, Hirokawa, J, Ohtsuka, Y, Kawakami, Y. Effect of insulin on impaired antioxidant activities in aortic endothelial cells from diabetic rabbits. *Metabolism* 1992; 41: 1053-1058.
22. Oberley, L, Bueftner, G. Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research* 1979; 39: 1141-1149.
23. Peskin, A, Koen, Y, Zbarsky, I. Superoxide dismutase y glutathione peroxidase activities in tumors. *Febs Lett* 1977; 78: 41-45.
24. Sahu, S, Oberley, L, Stevens, R, Riley, E. Superoxide dismutase activity of Ehrlich ascites tumor cells. *J Nat I Cancer Inst* 1977; 58: 1125-1128.
25. Yamanaka, N, Ota, K, Utsumi, K. Changes in superoxide dismutase activity using development, aging and transformation. In: Hayashi, O, Asada, K, Eds. *Biochemical and medical aspects of active oxygen*. Tokyo: University of Tokyo Press 1977; pp. 183-90.
26. Cullen, J, Weydert, C, Hinkhouse, M. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in the Growth of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Reserch* 2003; 63: 1297-1303.
27. Fernández, J, Oliva, B, Tejada, Y, Astrada, S, Garay, H, Reyes, O. The Antitumor Peptide CIGB-552 Increases COMMD1 and Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells. *J Amino Acids* 2013; 251398.
28. Edwards, S, Tolkovsky, A. Characterization of apoptosis in cultured rat sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Cell Biol* 1994; 124: 965-972.
29. Greenlund, L, Deckwerth, T, Johnson, E. Superoxide Dismutase Delays Neuronal Apoptosis: A Role for Reactive Oxygen Species in Programmed Neuronal Death. *Neuron* 1995; 14: 303-315.
30. Araujo, J, Breuer, P, Dieringer, S, Krauss, S, Dorn S, Zimmermann, K. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Human Molecular Genetics* 2011; 20: 2928-41.
31. Lee, J, Shin, J, Hwang, S, Gwag, B, McKee, A, Junghee Lee. MST1 functions as a key modulator of neurodegeneration in a mouse model of ALS. *PNAS* 2013; 110: 12066-71.
32. Castellano, I, Cecere, F, Vendittis, A, Cotugno, R, Chambery, A, Di Maro, A. Rat Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase: Amino Acid Positions Involved in Covalent Modifications, Activity, and Heat Stability. *Biopolymers* 2009; 91: 1215-26.
33. Candas, D, Fan, M, Nantajit, D, Vaughan, A, Murley, J, Woloschak, G. CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress. *Journal of Molecular Cell Biology* 2013; 5: 166-175.
34. Ubersax, J, Woodbury, E, Quang, P. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 2003; 425: 859-864.
35. Rudner, A, Murray, A. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 2000; 149: 1377-1390.
36. Stenlund, P, Tibell, L. Chimeras of human extracellular y intracellular superoxide dismutases. Analysis of structure y function of the individual domains. *Protein Engineering* 1999; 12: 319-325.
37. Summerer, D, Chen, S, Wu, N, Deiters, A, Chin, J, Schultz, P. A genetically encoded fluorescent amino acid. *PNAS* 2006; 103: 9785-9789.
38. Gurney, M. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-1775.
39. Banci, L, Bertini, I, Boca, M, Girotto, S, Martinelli, M, Valentine, J.S. et al. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *Plos One* 2008; 3: e1677.
40. Seiffers, R, Zhang, J, Matthews, J, Chen, A, Tamrazian, E, Babaniyi, O, et al. ATF3 expression improves motor function in the ALS mouse model by promoting motor neuron survival and retaining muscle innervation. *PNAS* 2013; 111: 1622-7.
41. Weisiger, R, Fridovich, I. Superoxide Dismutase. Organelle Specificity. *J Biol Chem* 1973; 248: 3582-3592.
42. Uchida, K, Kawakishi, S. Identification of Oxidized Histidine Generated at the Active Site of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Exposed to H₂O₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 2405-2410.
43. Veronese, F, Largajolli, R, Boccú, E, Benassi, C, Schiavon, O, et al. Surface modification of proteins activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1985; 11: 141-152.
44. Liu, T, Beckman, J, Freeman, B, Hogan, E, Hsu, C. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *AJP-Heart* 1989; 256: 589-593.
45. Fujita, T, Nishikawa, M, Tamaki, C, Takakura, Y, Hashida, M, et al. Targeted delivery of human recombinant superoxide dismutase by chemical modification with mono- and polysaccharide derivatives. *JPET* 1992; 263: 971-978.

46. Hirano, T, Todoroki, T, Morita, R, Kato, S, Ito, Y, Kim, K, et al. Anti-inflammatory effect of the conjugate of superoxide dismutase with the copolymer of divinyl ether and maleic anhydride against rat re-expansion pulmonary edema. *J Control Release* 1997; 48: 131-9.
47. Sakurai, K, Miyazaki, K, Kodera, Y, Nishimura, H, Shingu, M, Inada, Y. Antiinflammatory activity of superoxide dismutase conjugated with sodium hyaluronate. *J Glycoconj* 1997; 14: 723-8.
48. Ogino, T, Inoue, M, Ando, Y, Awai, M, Maeda, H, Morino, Y. Chemical modification of superoxide dismutase: Extension of plasma half-life of the enzyme through its reversible binding to the circulating albumin. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1988; 32: 153-159.
49. Valdivia, A, Domínguez, A, Pérez, Y, Caballero, J, Hernández, Y, Villalonga, R. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with Mannan. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2006; 44: 159-165.
50. Domínguez, A, Valdivia, A, Caballero, J, Martínez, G, Hernández, Y, Schacht, E, et al. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with carboxymethylcellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2005; 20: 557-70.
51. Ge, B, Scheller, F, Lisdat, F. Electrochemistry of immobilized CuZnSOD and FeSOD and their interaction with superoxide radicals. *Biosensors and Bioelectronics* 2001; 18: 295-302.
52. Endo, K, Miyasaka, T, Mochizuki, S, Aoyagi, S, Himi, N, Asahara, H, et al. Development of a superoxide sensor by immobilization of superoxide dismutase. *Sensors and Actuators* 2002; 83: 30-34.
53. Beissenhirtz, M, Scheller, F, Viezzoli, M, Lisdat, F. Engineered Superoxide Dismutase Monomers for Superoxide Biosensor Applications. *Anal Chem* 2006; 78: 928-935.
54. Villalonga, R, Cao, R, Frago, A, Damiao, A, Ortiz, P, Caballero, J. Supramolecular assembly of b-cyclodextrin-modified gold nanoparticles and Cu,Zn superoxide dismutase on catalase. *J Mol Cat* 2005; 35: 79-85.
55. Salimi, A, Noorbakhsh, A, Rafiee-Pour, H.A, Ghourchian, H. Direct Voltammetry of Copper,Zinc-Superoxide Dismutase Immobilized onto Electrodeposited Nickel Oxide Nanoparticles: Fabrication of Amperometric Superoxide Biosensor. *Electroanalysis* 2012; 23: 683-691.
56. Sheng, L, Zhang, X, Song, C. Preparation and characterization of a thermostable enzyme (Mn-SOD) immobilized on supermagnetic nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 96: 123-132.
57. Campanella, L, Favero, G, Tomassetti, M. Superoxide Dismutase Biosensors for Superoxide Radical Analysis. *Analytical Letters* 1999; 32: 2559-2581.
58. Emregul, E. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 383: 947-954.
59. Ellerby, L, Nishida, C, Nishida, F, Yamanaka, S, Dunn, B, Valentine, J, et al. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. *Science* 1992; 255: 1113-1115.
60. Vorauer-Uhl, K, Furnschliel, E, Wagner, A, Ferko, B, Katinger, H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 63-7.
61. Muscoli, C, Cuzzocrea, S, Riley, P, Zweier, J, Thiemermann, C, Wang, Z, et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 445-60.
62. Pluta J, Karolewicz B. Evaluation of bioadhesive properties of excipients containing lipophilic adjuvants. *Polim Med* 2003; 33: 3-16.
63. Domínguez, A, Valdivia, A, Hernández, J, Villalonga, R. Biocompatibilidad in vitro de superóxido dismutasa en interacción con polímero e hidrogeles de carboximetilcelulosa ensayado con fibroblastos humanos. *Biología Aplicada* 2004; 21: 218-223.



History of the modern neurosurgery

Title in Spanish: *Historia de la neurocirugía moderna*

Gregorio Rodríguez Boto¹

¹Servicio de Neurocirugía, Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT: The surgery of the nervous system is etymologically known as “Neurosurgery”. Although cranial trepanation is possibly the oldest operation which there are proven traces, from the Paleolithic period (12,000 years BC), Neurosurgery as a discipline of Medicine and Surgery specialty began as such at the end of XIX century. From that time until today can be sentenced to no other medical or surgical speciality that has experienced such a huge development in the span of little over a century. In this paper this historical development of what could be considered “modern” Neurosurgery is exposed. Additional emphasis is placed on what will be the Neurosurgery in the not too distant future, if not already present.

RESUMEN: La cirugía del sistema nervioso es etimológicamente conocida como “Neurocirugía”. Aunque posiblemente sea la trepanación craneal la operación más antigua de la cual existen huellas comprobadas, ya desde el período Paleolítico (12.000 años a. C.), la Neurocirugía como disciplina de la Medicina y especialidad de la Cirugía se inició como tal a finales del siglo XIX. Desde ese momento hasta nuestros días puede sentenciarse que no hay ninguna otra especialidad médica o quirúrgica que haya experimentado un desarrollo tan ingente en el lapso de poco más de un siglo. En este trabajo se expone este devenir histórico de la que puede considerarse como Neurocirugía “moderna”. Asimismo, se hace hincapié respecto a lo que será la Neurocirugía en un futuro no muy lejano, por no decir ya presente.

***Corresponding Author:** grboto@yahoo.es

Received: February 3, 2015 **Accepted:** February 24, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 1 (2015), pp. 37-47

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Puede definirse la Neurocirugía como “aquella disciplina de la Medicina y especialidad de la Cirugía que se ocupa del estudio y tratamiento (esto es, prevención, diagnóstico, evaluación, terapéutica, cuidado intensivo y rehabilitación), de las enfermedades quirúrgicas o potencialmente quirúrgicas del Sistema Nervioso Central, Periférico y Autónomo, incluyendo sus cubiertas, vascularización y anejos como la hipófisis, así como del manejo operatorio y no operatorio del dolor, cualquiera que sea la edad del paciente”.

De este modo, la Neurocirugía contempla el tratamiento de pacientes adultos o pediátricos con trastornos del Sistema Nervioso que comprenden la patología del encéfalo, las meninges, el cráneo y sus aportes vasculares, incluyendo las arterias carótidas y vertebrales, la patología de la hipófisis, la patología de la médula espinal, la columna vertebral y sus meninges, así como la patología de los nervios periféricos en toda su extensión.

Siguiendo a Jiménez Díaz, puede definirse al “médico” como “al hombre que hace Medicina para otro hombre”.

Parafraseando a Sixto Obrador, el “neurocirujano” representa la convergencia y asociación del “neurólogo”, en sus dimensiones teórico-clínicas, con el “cirujano”, en sus aspectos prácticos y terapéuticos.

Si bien los primeros pasos de mi especialidad fueron dados, por tanto, por cirujanos generales, sólo surgirá una auténtica Neurocirugía cuando el conocimiento y estudio del Sistema Nervioso por los neurólogos, se iguale o anteponga a la habilidad técnica de aquellos cirujanos generales. Así, Neurología y Cirugía serán las dos especialidades que converjan y se unan en la Neurocirugía (1,2).

2. HISTORIA DE LA NEUROCIRUGÍA MODERNA

Aunque la trepanación craneal, bien con fines mágico-religiosos bien terapéuticos, está considerada como la más antigua operación de la cual existen huellas comprobadas, con seguridad en el período Neolítico (alrededor de 5.000 años a. C.) y posiblemente mucho antes, en el Paleolítico (12.000 años a. C.), la Neurocirugía es una especialidad que se inicia como tal a finales del siglo XIX. Puede sentenciarse que desde la Prehistoria hasta ese momento,

la cirugía del Sistema Nervioso apenas evolucionó. Es entonces, segunda mitad del siglo XIX, cuando se van a producir dos hechos cruciales para el desarrollo de la misma. Por una parte, la creación de la moderna cirugía, condicionada por la aparición de la anestesia, de la antisepsia y de la asepsia, y por otra parte, el desarrollo de la Neurología como auténtico cuerpo de doctrina.

En la historia de la Medicina, la búsqueda de métodos capaces de hacer desaparecer el dolor durante las intervenciones quirúrgicas (bebidas alcohólicas, plantas medicinales, estupefacientes,...) fue siempre una constante preocupación. A finales del siglo XVIII, el cirujano inglés Moore comenzó a utilizar fuertes torniquetes que parecían mitigar el dolor en el curso de las amputaciones. Casi simultáneamente, Sir Humphry Davy señaló en Inglaterra la posibilidad de emplear el óxido nitroso contra los dolores de muelas, el llamado “gas hilarante”. En 1846, el cirujano John Collins Warren, en el Massachusetts General Hospital, extirpó un tumor benigno del cuello de un paciente bajo anestesia por éter, administrada por el dentista William Morton. La intervención fue un éxito total, marcando para la Cirugía el nacimiento de lo que el anatómico y poeta Oliver Wendell Holmes designará como “anestesia”.

Sin embargo, a pesar del avance que supuso la anestesia, la ampliación de las fronteras del saber quirúrgico sólo se realizó de forma notable tras la aparición de la antisepsia y de la asepsia. Joseph Lister (1827-1912), profesor de Cirugía en Glasgow, basándose en los estudios de Louis Pasteur y de Robert Koch, recomendó el empleo del fenol en el tratamiento de las heridas, iniciándose así la antisepsia. Sus ideas fueron rechazadas inicialmente por prestigiosos cirujanos ingleses y por la mayor parte de los cirujanos asistentes a la primera reunión de la “American Surgical Association”, en 1883. Un paso más allá de la antisepsia vino representado por la búsqueda de la asepsia en las intervenciones quirúrgicas. Ernst von Bergmann (1836-1907) utilizó la esterilización por el vapor, y cuando su discípulo Curt Schimmelbusch publicó y sistematizó dichos métodos, en 1891, podemos decir que la asepsia quirúrgica había comenzado.

En la segunda mitad del siglo XIX, la Neurología y la Neuropsiquiatría, van a cobrar una importancia trascendental. Los principales artífices de estos cambios de la Neurología Clínica van a ser los franceses Broca y Charcot, los alemanes Friedreich, Meynert, Von Leyden, Westphal y Erb, el inglés Jackson y el americano Mitchell. Desde el mismo momento en que existen unos hombres dedicados a estudiar la patología clínica del Sistema Nervioso, van a surgir una serie de procedimientos instrumentales de diagnóstico. De este modo, nace la electroencefalografía con Hans Berger, Albrecht Von Graefe introduce en el ámbito clínico, en 1860, el oftalmoscopio de Hermann Von Helmholtz, se inicia el estudio bioquímico del LCR tras la implantación de la punción lumbar por Heinrich Quincke y comienza la Neuroradiología de la mano de Artur Schüller.

La aparición de la anestesia quirúrgica, de la antisepsia y de la asepsia abrieron la posibilidad de realizar intervenciones quirúrgicas antes impensables. El inicio de la Neurología Clínica, en esta segunda mitad del siglo XIX, motivó a los cirujanos generales a practicar intervenciones quirúrgicas sobre el Sistema Nervioso, haciendo así posible el nacimiento de una nueva disciplina, la Neurocirugía. El desarrollo de la misma puede dividirse en tres períodos, a mi juicio. El primero de ellos, considerado como inicial, está caracterizado por la presencia de diversos cirujanos que comenzaron tímidamente a practicar intervenciones quirúrgicas sobre el Sistema Nervioso, pero sin hacer de ello su actividad profesional principal. Podría establecerse entre 1850 y 1900. En un segundo período, una serie de profesionales independientemente de cuál fuera su formación previa y el momento de su vida profesional, van a dedicarse de forma prácticamente exclusiva a la Neurocirugía. Se diría que transcurre entre 1900 y 1970. Es en esta época cuando se desarrolla la ingente labor de Harvey Cushing. EN 1971 se introdujo en la clínica la Tomografía Axial Computarizada, fruto de los trabajos de Allan Cormack y de Godfrey Hounsfield, merecedores del Premio Nobel de Medicina en 1979. A partir de este momento, arranca una nueva etapa en la Neurocirugía, presidida y dominada por los avances radiológicos y el refinamiento tecnológico. Esta etapa actual de la Neurocirugía está caracterizada por el incesante desarrollo de la misma, que ha logrado que el día de hoy sea pasado olvidado mañana. Obviamente, los dos primeros períodos en los que arbitrariamente he dividido el devenir histórico de la Neurocirugía moderna no se dan simultáneamente en todos los países. Por otro lado, muchos neurocirujanos ejercieron su actividad en más de una de estas etapas. Esta división temporal en etapas permite comprender el hecho de la aparición del cirujano dedicado exclusivamente al Sistema Nervioso y a quien, a partir de ese momento, podemos llamar “neurocirujano” (3,4).

2.1. Gran Bretaña

Los primeros pasos de la Neurocirugía tuvieron lugar en Gran Bretaña, de la mano de Macewen. Entre sus continuadores merecen ser destacados Horsley, Jefferson, Cairns y Dott.

Sir William Macewen (1848-1924) (Figura 1), escocés, aun siendo un cirujano general, puede considerarse un auténtico pionero de la Neurocirugía. En 1869 terminó sus estudios de Medicina y se unió a Joseph Lister, del que adoptó sus ideas. En 1877 fue nombrado cirujano en el “Glasgow Royal Infirmary”, donde sustituyó la traqueotomía por la intubación endotraqueal. Se interesó por los comas traumáticos y por las localizaciones cerebrales, lo que le permitió operar en 1876 un absceso cerebral y en 1879, un hematoma subdural y un meningioma de la convexidad. En 1883, realizó la primera laminectomía por compresión medular. En 1888 inició sus escritos sobre la cirugía del Sistema Nervioso, a la que denominó “Neurocirugía”. El “Johns Hopkins Hospital”

History of the modern neurosurgery

(Baltimore, Maryland) le ofreció una cátedra quirúrgica que él rechazó ya que no le permitía la formación y supervisión de sus propias enfermeras. Permaneció hasta su muerte, en 1924, como profesor de Cirugía en la Universidad de Glasgow.

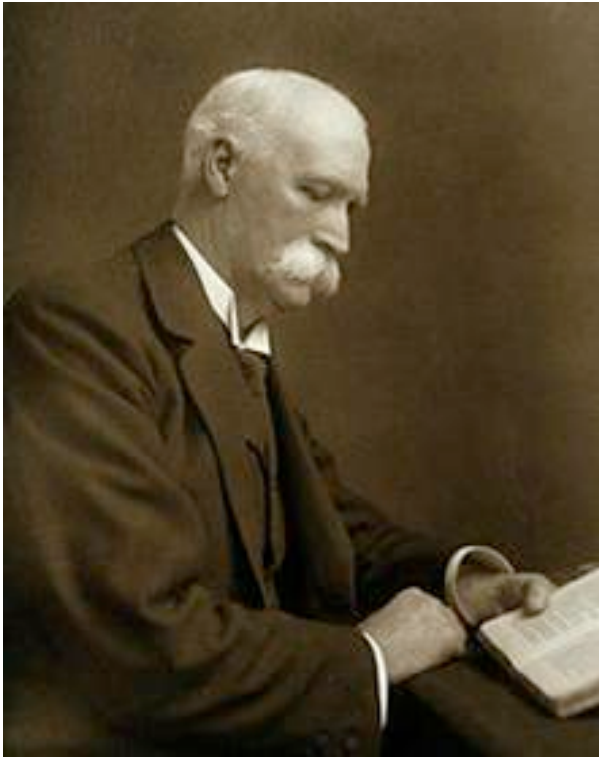


Figura 1. Sir William Macewey.

Sir Victor Horsley (1857-1916) (Figura 2) puede considerarse el primer neurocirujano de Inglaterra, pues fue abandonando paulatinamente la Cirugía General para dedicarse, hacia el final de su vida y de forma casi exclusiva, a la Neurocirugía. En 1859, se había inaugurado en Inglaterra el primer hospital consagrado exclusivamente a las enfermedades del Sistema Nervioso. Este hospital fue creado en Queen Square bajo el nombre de “National Hospital for Diseases of the Nervous System” y en principio estaba reservado para enfermos paralíticos y epilépticos. Más tarde, llegaría a ser el famoso “National Hospital for Nervous Diseases” y actualmente, el “National Hospital for Neurology and Neurosurgery”. En 1886, a los 29 años de edad, Victor Horsley operaba ya en el “The National” y en 1887 fue el primero en resear un tumor medular diagnosticado por el neurólogo, Sir William Gowers. Horsley aplicó una metodología científica a la consecución de mapas cerebrales, coincidiendo con las observaciones del neurólogo John Jackson en enfermos epilépticos, y fue el primero en producir experimentalmente una hipertensión intracraneal por medio de balones inflables. Descubrió la herniación cerebelosa, aportó la incisión curva para los colgajos cutáneos e ideó, junto con Robert Clarke, el primer aparato de estereotaxia para gatos. A los 59 años de edad, Sir Victor Horsley, se enroló en el cuerpo expedicionario inglés de Oriente Medio, falleciendo de una insolación en

un pequeño hospital de Mesopotamia.

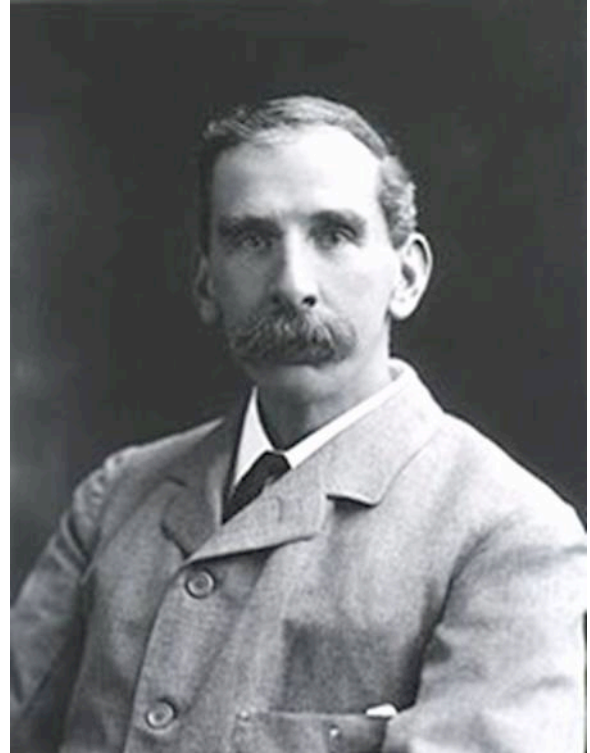


Figura 2. Sir Victor Horsley.

Sir Geoffrey Jefferson (1886-1961) (Figura 3) nació en Rochdale, Inglaterra, y cursó sus estudios en Manchester. En 1911 ejercía ya en Londres como cirujano, interesándose por la anatomía y la fisiología del Sistema Nervioso. En 1926 comenzó a ejercer la neurocirugía en Manchester, donde ocupó la primera cátedra de Neurocirugía, creada en 1939. Sus aportaciones más importantes se centraron en el ámbito de la traumatología craneoencefálica, de los adenomas de hipófisis, de los aneurismas intracraneales y de la neurorradiología.



Figura 3. Sir Geoffrey Jefferson.

Sir Hugh Cairns (1896-1952) (Figura 4) nació en Australia, en el seno de una familia de origen escocés, alcanzando el grado de doctor en Medicina por la Universidad de Adelaida. Por medio de una beca pudo trasladarse a Oxford. En 1926 conoció en Boston a Harvey Cushing, regresando a Inglaterra posteriormente y creando en el “Royal London Hospital”, un Servicio dedicado exclusivamente a la Neurocirugía. Diez años más tarde se trasladó a Oxford con todo su equipo, para ocupar una cátedra de Neurocirugía en la “Radcliffe Infirmary”, puesto en el que permaneció hasta el final de su vida profesional y que sólo abandonaría durante la segunda guerra mundial para dedicarse a la organización de los Servicios de la Sanidad Militar. Cairns fue un trabajador sistemático y constante en su actividad neuroquirúrgica y para nosotros tiene un significado especial, pues alojó a Pío del Río Hortega, exiliado de España por la guerra civil, poniendo a su disposición un modesto laboratorio y contribuyendo así a la obra de la Escuela Española de Neuropatología.



Figura 4. Sir Hugh Cairns.

Norman Dott (1897-1973) (Figura 5) realizó sus estudios en la Universidad de Edimburgo y su dedicación a la Neurocirugía estuvo directamente influida por Harvey Cushing y Percival Bailey. Fue el primero en operar en Gran Bretaña un aneurisma intracraneal, en 1933, diagnosticado por medio de la angiografía que había sido introducida poco tiempo antes por Egas Moniz. En 1947 fue nombrado catedrático de Cirugía Neurológica y en 1960 inauguró un moderno Departamento de Neurocirugía en el marco del “Western General Hospital” de Edimburgo.



Figura 5. Norman Dott.

2.2. Los Estados Unidos

Pero si bien podemos considerar que la Neurocirugía se inicia en Gran Bretaña, su consagración como especialidad independiente ocurrió en Los Estados Unidos y fue consecuencia lógica de la figura y obra de Harvey Cushing.

Harvey Williams Cushing (1869-1939) (Figura 6) nació en Cleveland, Ohio. Cursó la carrera de Medicina en la Universidad de Harvard. Su estancia en el “Massachusetts General Hospital” de Boston le permitió apreciar de primera mano los resultados decepcionantes de la cirugía cerebral, lo que al parecer le motivó para interesarse por este campo. Finalizados sus estudios se dirigió al “Johns Hopkins Hospital” de Baltimore, donde el gran cirujano estadounidense William Halsted le admitió como residente de Cirugía General, tratando de orientarle hacia la Traumatología. Entre 1897 y 1900, Cushing, en el “Johns Hopkins Hospital”, comenzó sus estudios de neurocirugía experimental en el “Hunterian Laboratory”. Tras este período se trasladó a Inglaterra, donde tomó contacto con Horsley, sin que le llegara a agrandar la técnica rápida que éste practicaba. Posteriormente, trabajó en Berna al lado del Premio Nobel de Medicina Emil Kocher. Más tarde conoció transitoriamente la naciente neurocirugía francesa, visitó diversos hospitales italianos y finalmente se trasladó de nuevo a Inglaterra, donde permaneció durante un mes en el laboratorio del neurofisiólogo Charles Sherrington, Premio Nobel de Medicina en 1932. En 1901 Cushing regresó al “Johns Hopkins Hospital” con la firme decisión de dedicarse exclusivamente a la cirugía del Sistema Nervioso, momento crucial para el desarrollo de mi especialidad, pues en virtud de esta decisión la cirugía del Sistema

History of the modern neurosurgery

Nervioso comenzará a llamarse ya, con toda propiedad, “Neurocirugía”. En 1911 fue nombrado Jefe de un Servicio de Clínica Quirúrgica en el “Peter Bent Brigham Hospital” de Boston y en 1912, profesor de Cirugía en la Universidad de Harvard. Entre esta fecha y 1932 se desarrolló la extraordinaria actividad neuroquirúrgica de Cushing, sólo interrumpida por la Primera Guerra Mundial, que le llevó a ejercer como cirujano general en Europa, de la mano del general norteamericano John Pershing. Tras retirarse de su actividad neuroquirúrgica en 1932, Cushing se trasladó a la Universidad de Yale, donde fue profesor de Neurología y luego de Historia de la Medicina. Entre las innumerables aportaciones de CUSHING baste decir que publicó 24 libros y 658 trabajos. Además, sus contribuciones técnicas fueron incontables no solo en Neurocirugía, sino también en otros campos de la Medicina. Así, introdujo la recogida de la tensión arterial y el empleo sistemático de las gráficas de anestesia durante las intervenciones quirúrgicas, realizó importantes trabajos experimentales en cirugía cardiovascular, investigó sobre los mecanismos reguladores de la presión arterial y su relación con la hipertensión intracraneal (“efecto Cushing”), hizo importantes aportaciones a la hemostasia quirúrgica creando desde un torniquete neumático para hemostasia del cuero cabelludo hasta un sistema de electrocoagulación e inventó los clips neuroquirúrgicos de plata. Su habilidad quirúrgica le permitió abordar campos del Sistema Nervioso hasta entonces inalcanzables por lo que se considera el padre de la “Neurocirugía”.



Figura 6. Harvey W. Cushing.

Walter Dandy (1886-1945) (Figura 7) nació en Sedalia, Missouri, terminando sus estudios de Medicina en la

“Johns Hopkins University School of Medicine”, en 1910. Posteriormente, realizaría la residencia de Cirugía General en el “Johns Hopkins Hospital” bajo la dirección de Halsted, su mentor. Su personalidad le llevó a múltiples enfrentamientos personales con Cushing, del que fue residente durante un año, antes de que éste se trasladara a Harvard. El hecho de que ambos fueran contemporáneos hizo que la figura de Dandy quedara levemente enmascarada ante la de Cushing. Sin embargo, su extraordinaria destreza y rapidez quirúrgica amén de sus geniales aportaciones, le han hecho ocupar un puesto prominente en la historia de la Neurocirugía. Su actividad neuroquirúrgica se desarrolló enteramente en el “Johns Hopkins Hospital”. Realizó importantes estudios sobre la circulación del líquido cefalorraquídeo, la hidrocefalia experimental y su tratamiento quirúrgico; en concreto, describió lo que sería posteriormente la endoscopia cerebral. En 1918, a los 32 años de edad, publicó en la revista “Annals of Surgery” su mayor aportación, la ventriculografía. Un año más tarde, en 1919, descubriría la neumoencefalografía. Dandy fue el primero en reseca totalmente un neurinoma del acústico en 1917, cirugía en la que alcanzó unas cifras de mortalidad tan bajas que resultan difíciles de igualar con los avances técnicos actuales. Fue también el primero, en los Estados Unidos, que clipó un aneurisma intracraneal, en 1937. Otras aportaciones suyas fueron la sección en la fosa posterior del nervio trigémino para el tratamiento de la neuralgia trigeminal y del VIII par craneal para el tratamiento del vértigo de Ménière. Además, fue el primero en crear una Unidad Neuroquirúrgica de Cuidados Intensivos.



Figura 7. Walter Dandy.

Washington Adson (1887-1951) (Figura 8) ocupó una

plaza de cirujano en la “Mayo Clinic”, en Rochester (Minnesota), donde pronto se ocuparía de la Neurocirugía. Sus aportaciones más importantes tuvieron lugar en la cirugía de la neuralgia del glossofaríngeo. Además, creó diversos instrumentos utilizados hoy día en todos los Servicios neuroquirúrgicos, como las bien conocidas “pinzas de Adson”.



Figura 8. Washington Adson.

Percival Bailey (1892-1973) (Figura 9) fue un cultivador tanto de la Neurocirugía como de la Neuroanatomía, de la Neuropatología, de la Neurofisiología y de la Neuropsiquiatría. Cursó sus estudios de Medicina en la Universidad de Chicago y en 1919 se trasladó al “Peter Bent Brigham Hospital” de Boston para iniciarse en la Neurocirugía al lado de Cushing. En 1928 se estableció de nuevo en Chicago como neurocirujano. A partir de 1939, la actividad profesional de Bailey se orientó hacia la Neurología y después hacia la Psiquiatría, siendo nombrado en 1951 “Director del Instituto Psiquiátrico del Estado de Illinois”. Entre sus aportaciones neuroquirúrgicas destacan sus obras sobre los tumores intracraneales, realizando junto a Cushing en 1926, una clasificación de los tumores cerebrales que ha pasado a la historia. Igualmente, son dignos de mención sus estudios respecto a la epilepsia y su conocido atlas estereotáxico.

La ingente labor de Cushing y sus coetáneos se plasmará en la creación de la “Society of Neurological Surgeons” en 1920 y de la “Harvey Cushing Society” en 1931, actualmente conocida como “American Association of Neurological Surgeons”. Ambas se constituyeron en las primeras Sociedades Científicas mundiales en el ámbito de la Neurocirugía y posicionaron a los Estados Unidos, sin

duda alguna, a la cabeza de la Neurocirugía mundial en aquella época.



Figura 9. Percival Bailey.

2.3. Canadá

En Canadá, la Neurocirugía va a consolidarse por obra de Penfield. Wilder Penfield (1891-1976) (Figura 10) nació en Spokane, estado de Washington. Su formación fue sólida como consecuencia de sus viajes a Europa, donde recibió la huella de Sherrington, Ramón y Cajal y Del Río Hortega. Entre 1921 y 1924 se formó como cirujano en el “New York-Presbyterian Hospital” y en 1925 fue nombrado Profesor Asistente de Investigación Neuroquirúrgica. En 1928, PENFIELD se trasladó al “Royal Victoria Hospital” y a la “McGill University” de Montreal, para hacerse cargo de los casos neuroquirúrgicos. En 1934, con ayuda de una subvención de la “Rockefeller Foundation” y el apoyo del gobierno de Quebec, inauguró el “Montreal Neurological Institute”, donde formó una magnífica escuela que tantas aportaciones harían en el campo de la estimulación cerebral y en la cirugía de la epilepsia.



Figura 10. Wilder Penfield.

2.4. Países escandinavos

En los países escandinavos los inicios de la Neurocirugía están ligados al danés Edouard Busch, al noruego Arn Torkildsen con sus aportaciones técnicas al tratamiento de la hidrocefalia no comunicante y a la excelsa escuela sueca de Neurocirugía, con Herbert Olivecrona (Figura 11a) a la cabeza y singularmente, con Lars Leksell (Figura 11b). Este último, a mediados del siglo XX, desarrolló la estereotaxia en humanos e inventó la radiocirugía, creando así una nueva Neurocirugía funcional y la moderna psicocirugía, lo cual supuso un punto de inflexión en la Neurocirugía sin parangón alguno.



Figura 11a. Herbert Olivecrona.

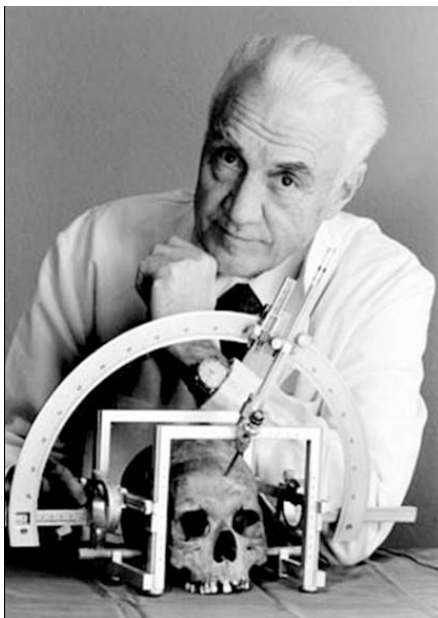


Figura 11b. Lars Leksell.

2.5. Rusia

En Rusia, la Neurocirugía nació con Ludvig Puusepp

(1875-1942) (Figura 12a) y con Nikolay Burdenko (1876-1946) (Figura 12b). Este último comenzó en 1924 sus actividades neuroquirúrgicas en Moscú, consolidando pronto la especialidad e inaugurando en 1934, el Instituto de Neurocirugía que lleva su nombre, el Instituto Burdenko, primer instituto neuroquirúrgico del mundo.



Figura 12a. Ludvig Puusepp.



Figura 12b. Nikolay Burdenko.

2.6. Alemania

En Alemania, se considera a Fedor Krause (1857-1937) (Figura 13) el fundador de la Neurocirugía en este país. Se inició como cirujano general, pero pronto se polarizó hacia la Neurocirugía, describiendo en 1892 su técnica para abordar extraduralmente el ganglio de Gasser, en la base craneal. Parece ser que fue el primero en operar una hernia

de disco lumbar, antes de las observaciones que sobre esta patología hiciera Walter Dandy en 1929. Su experiencia, adquirida en el “Augusta Hospital” de Berlín, se recoge en su tratado “Cirugía del Cerebro y de la Médula”, publicado entre 1908 y 1911.



Figura 13. Fedor Krause.

2.7. Suiza

En Suiza, la Neurocirugía se consolida con la figura de Hugo Krayenbühl, que fue nombrado profesor de Neurocirugía en Zúrich en 1948, creando una magnífica escuela. Tras su jubilación, en 1973, le sucedió Gazi Yaşargil, que pronto llegaría a ser una de las figuras más destacadas de la Neurocirugía mundial, junto con Harvey Cushing. Gazi Yaşargil (Figura 14), de origen turco, nació en 1925. Estudió Medicina en la Universidad de Jena (Alemania), afincándose posteriormente en Zúrich. Fundador de la microneurocirugía, hizo posible realizar operaciones antes impensadas, particularmente en la patología cerebrovascular, cambiando por completo el paradigma de la especialidad y revolucionando la misma. De 1973 a 1993 practicó un total de 7.500 operaciones intracraneales. Trató quirúrgicamente la epilepsia y los tumores cerebrales, con instrumental de diseño propio. En 1994, se trasladó a la Universidad de Arkansas, en Little Rock, donde aún permanece activo. Gazi Yaşargil es una auténtica leyenda viva de la Neurocirugía, pues ha tenido el privilegio de conocer lo que yo he pergeñado como las tres etapas de la Neurocirugía moderna y de protagonizar en primera persona la última de ellas.

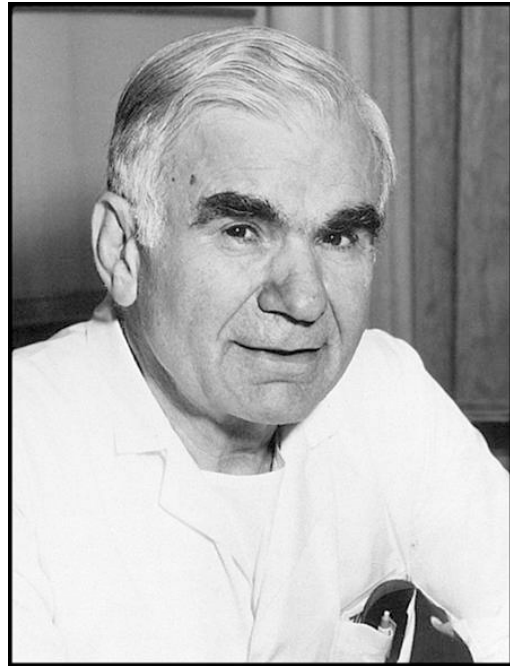


Figura 14. Gazi Yaşargil.

2.8. Francia

En Francia, De Martel y Vincent hicieron posible de forma definitiva la Neurocirugía.

Thierry de Martel (1875-1940) (Figura 15a) se vio orientado por Joseph Babinski hacia la Neurología y posteriormente hacia la Neurocirugía, iniciando sus intervenciones bajo las directrices diagnósticas de aquél. Entre las mayores aportaciones de De Martel, hemos de citar la introducción de la posición sentada para las intervenciones sobre la fosa posterior, del trépano con parada automática y de diversos separadores automáticos.



Figura 15a. Thierry de Martel.

History of the modern neurosurgery

Clovis Vincent (1879-1947) (Figura 15b) fue en primer lugar neurólogo, discípulo de Babinski. Íntimo amigo de De Martel, fue poco a poco polarizándose hacia la Neurocirugía. Traslataba personalmente los enfermos que diagnosticaba en “La Pitié” hasta la clínica de De Martel, donde ayudaba a éste en las intervenciones. Durante una ausencia de De Martel, que tuvo que viajar a Bagdad para operar a un personaje importante, Vincent no tuvo más remedio que operar los casos urgentes, naciendo en él definitivamente la vocación por la Neurocirugía. Clovis Vincent inició así, a sus 48 años de edad, su carrera neuroquirúrgica, haciendo de neurólogo, de neurorradiólogo y de neurocirujano en una pequeña clínica y renunciando a una magnífica posición como neurólogo clínico en “La Pitié”. Los esfuerzos y la tenacidad de Clovis Vincent se vieron recompensados en 1933, cuando se creó para él un Servicio de Neurocirugía en dicho hospital, lo que marcaría la consolidación de la especialidad en Francia. En 1938, con la ayuda de la “Rockefeller Foundation”, este Servicio se transformó en la primera cátedra francesa de Clínica Neuroquirúrgica. Clovis Vincent mandaba la mayor parte de los tumores cerebrales que operaba a Del Río Hortega, en España, para su estudio anatomopatológico. Sus aportaciones más notables se centraron en el campo de la neurotraumatología y en el de los abscesos cerebrales. En este último terreno preconizó, en los abscesos agudos, hacer una gran craniectomía descompresiva sin apertura de la duramadre, seguida de punciones evacuadoras hasta que el absceso se encapsulara y pudiera ser abordado unas semanas más tarde. Con esta técnica, Vincent revolucionó el pronóstico del absceso cerebral en una época en la que los antibióticos eran desconocidos.



Figura 15b. Clovis Vincent.

2.9. Portugal

En Portugal, la Neurocirugía está íntimamente ligada a

la figura de Egas Moniz. António Caetano de Abreu Freire Egas Moniz (1874-1955) (Figura 16), de formación eminentemente francesa, fue profesor de Medicina Interna en Coimbra y de Neurología en Lisboa. A los 52 años de edad, en 1926, introdujo la angiografía como proceder diagnóstico revolucionario. Entre 1930 y 1935, envió a su colaborador Almeida Lima a entrenarse en Neurocirugía con Cairns. Junto con aquél, Egas Moniz realizó después sus importantes aportaciones a la psicocirugía que le llevarían a obtener el Premio Nobel de Medicina en 1949, “por el descubrimiento del valor terapéutico de la lobotomía en determinadas psicosis” (sic). Egas Moniz ha sido el único neurocirujano del mundo que ha alcanzado tan preciado laurel. Fue además, Ministro de Asuntos Extranjeros de Portugal y vivió los últimos 17 años de su vida parálítico tras ser tiroteado por uno de sus pacientes psiquiátricos.



Figura 16. Egas Moniz.

No obstante, el reconocimiento oficial de la Neurocirugía en Portugal no tuvo lugar hasta 1954, cuando Vasconcelos Marques obtuvo un puesto de Jefe de Clínica Neuroquirúrgica y organizó, un año más tarde, el primer Servicio de Neurocirugía de Portugal en el Hospital Civil de Lisboa.

2.10. España

En España, la patología del Sistema Nervioso cobró importancia a finales del siglo XIX gracias a la Escuela Española de Neurohistología o Neuropatología (Santiago Ramón y Cajal, Nicolás Achúcarro, Fernando de Castro, Pío del Río Hortega, Rafael Lorente de No y Jorge Francisco Tello, entre otros) y al germen de la Neurología Clínica que quebraba albos por aquel entonces en nuestro país (Luis Barraquer Roviralta, Enrique Fernández Sanz, Gonzalo Rodríguez Lafora, Luis Simarro Lacabra y José María Villaverde y Larraz, entre otros).

Así, en los últimos años del siglo XIX, la Neurocirugía arrancó tímidamente en algunos centros quirúrgicos de Madrid, de Barcelona (el Hospital de la Santa Cruz), de Bilbao y de Zaragoza. Entre todos estos iniciadores, deben destacarse las figuras de Larra Cerezo (Figura 17a) en el Hospital Militar de Carabanchel, de Cervera Ruiz (Figura 17b) y de Otero Acevedo (Figura 17c), estos dos últimos en el Instituto de Terapéutica Operatoria dirigido por Federico Rubio. Otero Acevedo (1865-1920) fue nombrado por el mismo Federico Rubio “Profesor de Cirugía Nerviosa” y puede sentenciarse que fue el precursor de la especialización neuroquirúrgica en España.



Figura 17a. Larra Cerezo.



Figura 17b. Cervera Ruiz.



Figura 17c. Otero Acevedo.

Entre 1920 y 1949 la Neurocirugía en nuestro país fue cultivada por una serie de cirujanos eminentes, pero sin llegar a cristalizar en una auténtica especialidad. Vara López (1904-1982) (Figura 18) destaca entre ellos. Aunque nunca fue un cirujano consagrado exclusivamente a la Neurocirugía, la dedicó gran parte de su actividad, habiendo recibido su aprendizaje de prestigiosos neurocirujanos internacionales.



Figura 18. Vara López.

La aparición de una auténtica actividad neuroquirúrgica en nuestro país tuvo lugar a partir del año 1949, fecha en que se fundó la Sociedad Luso-Española de Neurocirugía, por Juan José Barcia Goyanes, Adolfo Ley Gracia, Sixto Obrador Alcalde y Eduardo Tolosa Colomer, junto a los portugueses Pedro Almeida Lima y António Vasconcelos Marques. Esta Sociedad Luso-Española de Neurocirugía, la segunda en el mundo tras las dos estadounidenses, tuvo como Presidente Honorario a Egas

Moniz.

Adolfo Ley Gracia (1908-1975) (Figura 19a) y Sixto Obrador Alcalde (1911-1978) (Figura 19b) pueden considerarse los auténticos creadores de la Neurocirugía española y de su escuela, pues escuela es como dijera Jiménez Díaz, “el intento de transmitir un estilo”. Adolfo Ley, formado con Puusepp y con Bailey, desarrolló su labor neuroquirúrgica pionera en Barcelona, dejando tras de sí una escuela de excelsos neurocirujanos. Sixto Obrador se formó en los aspectos básicos de las ciencias neurológicas en los laboratorios de Ramón y Cajal, Del Río Hortega y Sherrington, trabajando posteriormente al lado de Cairns en Londres y de Dott en Edimburgo. En 1946 se instaló en Madrid, creando un Instituto de Neurocirugía en un chalet de la calle Olivos del parque Metropolitano de la misma ciudad. Posteriormente, fundó una amplia escuela neuroquirúrgica en la que quien suscribe ha tenido el honor de haberse formado. Asimismo, impulsó el desarrollo de mi especialidad con la creación de diversos Servicios de Neurocirugía en la capital.

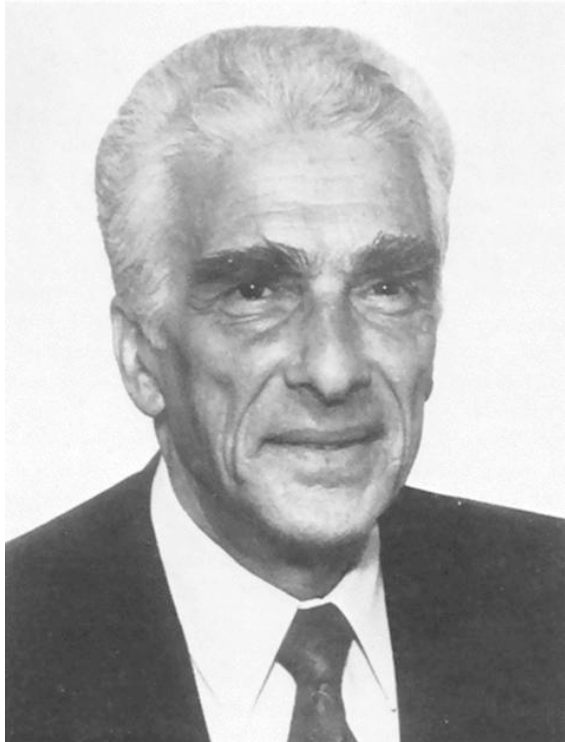


Figura 19a. Adolfo Ley Gracia.

Hemos visto cómo en el devenir histórico, la Neurocirugía sólo adquiere entidad real cuando surge la figura del neurocirujano, esto es, de un profesional con mayor o menor formación neurológica, con mayor o menor experiencia en neuroanatomía, neuropatología o neurofisiología, pero en definitiva un profesional que se va a dedicar prioritariamente a los aspectos quirúrgicos del Sistema Nervioso. Va a ser la aparición de este personaje lo que va a determinar que la hasta entonces “Cirugía del Sistema Nervioso” deje de llamarse así, para denominarse ya con propiedad “Neurocirugía”. Posiblemente inferido

de lo que expuesto hasta este momento, no haya ninguna otra especialidad médica o quirúrgica que haya experimentado un desarrollo tan ingente en el lapso de poco más de un siglo (3,4).



Figura 19b. Sixto Obrador Alcalde.

3. “NEUROCIURUGÍA DEL FUTURO”

La “Neurocirugía del futuro” puede decirse de alguna forma que ya es presente, como las “suites neuroquirúrgicas” en las que se integra todo el equipamiento tecnológico que actualmente requiere el tratamiento neuroquirúrgico de un paciente, incluida la resonancia magnética intraoperatoria. No obstante, si miramos hacia adelante me atrevo a decir que el abanico de posibilidades tecnológicas futuristas puede llegar a ser prácticamente ilimitado. En este sentido, me refiero expresamente a intervenciones neuroquirúrgicas realizadas por robots que incluso pueden llegar a practicarse a distancia (“telerrobótica”) y a todas las posibilidades de regeneración del Sistema Nervioso que se abren gracias a la terapia con células madre, en la que la Neurocirugía ha depositado tantas esperanzas e ilusiones.

4. REFERENCIAS

1. Rodríguez Boto G. Memoria de Proyecto Docente e Investigador. Madrid: Universidad Complutense de Madrid 2007.
2. Laín Entralgo P. Historia universal de la Medicina. Barcelona: Salvat 1975.
3. Obrador Alcalde S. Comienzo y evolución de la moderna Neurocirugía. En Tumores Intracraneales. Madrid: Paz Montalvo 1955.
4. Vaquero J. Patología quirúrgica del sistema nervioso. Madrid: Ramón Areces 2006.



Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides that stimulate the gut microbiota

Title in Spanish: *Síntesis enzimática de fructooligosacáridos estimuladores de la microbiología colónica*

Paloma Santos-Moriano^{1*} Lucía Fernández-Arrojo¹ Bárbara Rodríguez-Colinas¹ Antonio Ballesteros¹ Francisco J. Plou¹

¹Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC 28049 Madrid Spain

ABSTRACT: The control of the intestinal flora is one of the targets of the functional foods and nutraceuticals. A symbiotic equilibrium can be achieved by the intake of live microorganisms (probiotics) or by the so-called prebiotics (non-digested oligosaccharides). Prebiotics are selectively fermented by the human microbiota allowing specific changes and conferring benefits upon host well-being and health. Among prebiotics fructooligosaccharides (FOS) constitute one of the most established groups. Levansucrases (EC 2.4.1.10) are a family of enzymes that catalyse the transfer of the fructosyl moiety from sucrose to different acceptors such as: (1) sucrose -yielding FOS that can be further fructosylated forming levan a polymer with food and biomedical applications -; (2) water resulting in sucrose hydrolysis. In this work a levansucrase from *Zymomonas mobilis* was characterized and the reaction products using sucrose as substrate were analysed by High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC-PAD). The number of FOS synthesized by the soluble enzyme was significantly higher compared with previous reports. In order to optimize the biocatalytic process the enzyme was further immobilized by entrapment in calcium alginate gel and the resulting beads were dehydrated to obtain DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes). Different immobilization strategies were studied to minimize enzyme loss (lixiviation) throughout the pores. The effect of enzyme immobilization on levansucrase behaviour was also analysed.

RESUMEN: El control de la microflora intestinal es uno de los objetivos de los alimentos funcionales y nutracéuticos. El equilibrio simbiótico puede lograrse mediante la ingesta de microorganismos vivos (probióticos) o de los denominados prebióticos (oligosacáridos no digeribles). Los prebióticos son fermentados selectivamente por la microbiota generando cambios específicos en su composición que producen un beneficio en la salud del hospedador. Entre los prebióticos los fructooligosacáridos (FOS) constituyen uno de los grupos más importantes. Las levansacarasas (EC 2.4.1.10) son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fructosilo desde una sacarosa a diferentes aceptores entre ellos otra molécula de sacarosa dando lugar a FOS sobre los que puede transferir otro grupo fructosilo para llegar a formar levan un polímero con aplicaciones en alimentación y biomedicina. Si el grupo fructosilo se transfiere sobre una molécula de agua da lugar a la hidrólisis de la sacarosa. En este trabajo se caracterizó una levansacarasa de *Z. mobilis* y los productos de reacción con sacarosa como sustrato se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). Con objeto de optimizar el proceso biocatalítico la enzima se inmovilizó por atrapamiento en geles de alginato cálcico y las esferas resultantes se deshidrataron para formar DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes). Se probaron diferentes estrategias de inmovilización para minimizar la pérdida de la enzima por los poros. El efecto de la inmovilización en el comportamiento de la levansacarasa fue analizado.

*Corresponding Author: paloma.santos@csic.es

Received: February 3 2015 Accepted: February 27 2015

An Real Acad Farm Vol. 81 N° 1 (2015) pp. 48-62

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La microflora o microbiota intestinal se define como un complejo ecosistema dinámico de especies microbianas residentes en el intestino humano el cual es colonizado por un gran número de bacterias. Como puede observarse en la Figura 1 estos microorganismos van aumentando su concentración desde la boca hasta el recto siendo máxima en el colon con aproximadamente 10^{12} UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de contenido intestinal. El colon está habitado por unas cuatrocientas

especies bacterianas (1) y se divide en colon ascendente o proximal colon transversal colon descendente o distal y colon sigmoidal. Las bacterias presentes tienen actividades fluctuantes en función de la disponibilidad de sustrato pH potencial redox y distribución en el colon (2). Así los microorganismos residentes en el colon proximal tienen un suministro abundante de nutrientes provenientes de la dieta de modo que crecen muy rápido causando una disminución del pH. Sin embargo en el colon distal la disponibilidad de sustrato es menor las bacterias crecen más lentamente y el pH se acerca a la neutralidad (3).

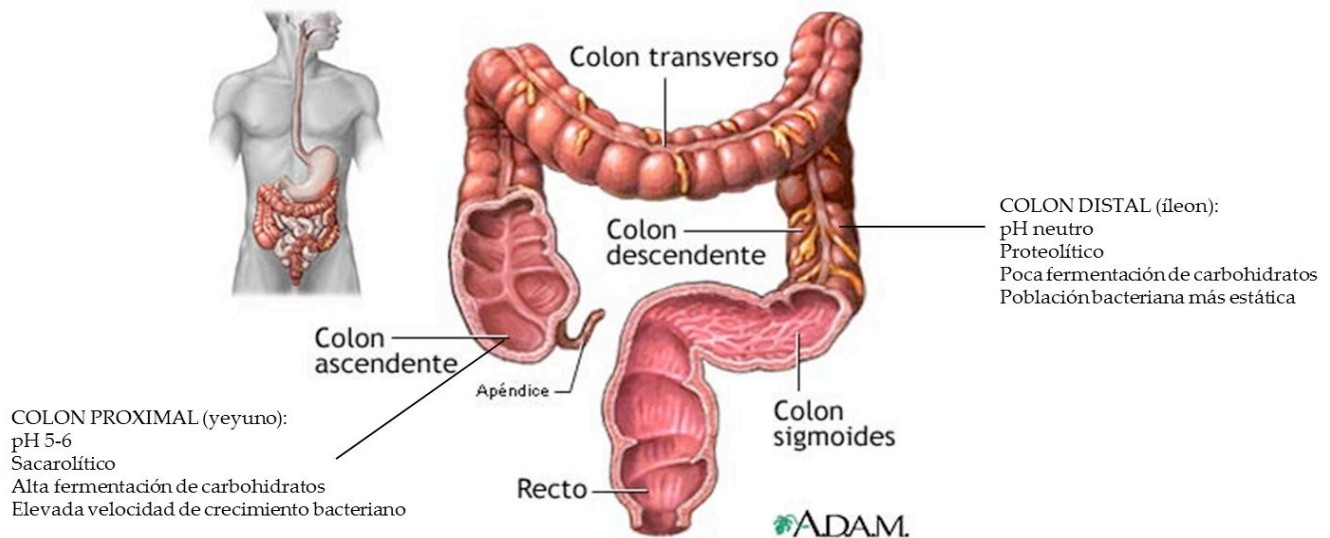


Figura 1. Esquema de los microorganismos característicos de las distintas secciones del tracto gastrointestinal (adaptado de Mayo y Delgado 2003 (4)) y de las regiones del colon humano con sus correspondientes actividades bacterianas y diferencias fisiológicas (adaptado de Macfarlane 2008 (5)).

Las funciones metabólicas de la microbiota intestinal consisten en la fermentación de sustratos dietéticos no digeribles. En concreto la fermentación de los hidratos de carbono es una importante fuente de energía para la proliferación bacteriana en el colon y produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Mediante esta acidificación se favorece la absorción de minerales como Fe Mg y Ca. La actividad metabólica también incluye la producción de algunas vitaminas tales como vitamina K B12 biotina ácido fólico ácido pantoténico y la síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o de urea (6). Son muchos los factores que pueden influir sobre los niveles de estas poblaciones microbianas alterando el equilibrio bacteriano de la flora intestinal tales como la dieta el estrés malos hábitos administración de antibióticos etc (7). Recientemente en un estudio llevado a cabo con 22 individuos clasificaron 3 enterotipos humanos caracterizados por su microbiota intestinal: enterotipo 1 donde predominan *Bacteroides*; enterotipo 2 dominando la especie *Prevotella*; y enterotipo 3 con mayor proporción de *Ruminococcus*. Estos enterotipos parecen venir determinados fundamentalmente por la dieta a largo plazo (8). Lo fundamental es mantener un equilibrio entre las distintas especies bacterianas evitando la excesiva proliferación de aquellas potencialmente patógenas y obtener así una microflora intestinal sana (9). Este equilibrio se puede restablecer mediante la ingesta de alimentos funcionales o bien microorganismos vivos probióticos o bien mediante el consumo de oligosacáridos prebióticos.

Los prebióticos son ingredientes que son selectivamente fermentados por la microflora intestinal provocando cambios específicos tanto en su composición como en su actividad aportando efectos beneficiosos sobre la salud humana (10). Su consumo produce un aumento en la proporción de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus*

y *Bifidobacterium* frente a otras especies mostrando una mejora en la salud del individuo (11). Conviene diferenciarlos de los probióticos que se definen como organismos exógenos vivos que resisten a la digestión normal alcanzando el colon e influyendo así de manera positiva en la composición de la microflora intestinal (1). Los simbióticos resultan de la combinación de probióticos y prebióticos en un mismo producto para mejorar la supervivencia e implantación de los microorganismos en el tracto gastrointestinal. Los principales efectos beneficiosos de los prebióticos se deben a la presencia de una flora predominantemente bifidogénica. Estos efectos se pueden dividir en tres: la acción inmunoprotectora la acción metabólica por la producción de AGCC y la acción nutricional ya que las bifidobacterias favorecen la síntesis de algunas vitaminas como B6 B12 etc. y ayudan a la absorción de Ca Mg Fe y Zn. Además los prebióticos son bajos en calorías y anticariogénicos.

Los prebióticos tienen una serie de ventajas frente a los probióticos: estimulan a toda la microbiota no sólo a una cepa; son más estables y se pueden añadir como aditivos a una gama más amplia de productos; y es más fácil que lleguen intactos al colon que las bacterias que tienen que sobrevivir al tracto digestivo.

En la Tabla 1 se detallan los carbohidratos aceptados como prebióticos hasta el momento. Los fructanos tipo inulina se encuentran en numerosas especies vegetales la oligofructosa se obtiene de la hidrólisis parcial de la inulina los FOS y GOS a partir de la síntesis enzimática de sacarosa y lactosa respectivamente y la lactulosa se obtiene industrialmente por isomerización de la lactosa.

Los FOS son oligosacáridos de D-fructosa (F) con una D-glucosa (G) terminal en los que los grupos fructosilo se unen mediante enlaces glicosídicos $\beta(2 \rightarrow 1)$ formando la serie $^1\text{F-FOS}$. Cuando la unión se realiza mediante enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$ se denomina serie $^6\text{F-FOS}$ si se trata de una fructosa y $^6\text{G-FOS}$ cuando la unión tiene lugar con la

glucosa (12) representándose algunas de estas estructuras en la Figura 2.

Tabla 1. Clasificación de carbohidratos aceptados como prebióticos (10).

Prebiótico	Grado de polimerización	Nombre comercial	Producción (Tm/año)	Enzima utilizada
Inulina (Fru) _n -Glc	n = 2-60	Raftiline	> 20 000	Extracción directa
FOS Oligofructosa (Fru) _n -Glc	n = 2-9	Actilight Raftilosa	12 000	Fructosiltransferasa Inulinasa
GOS (Gal) _n -Glc	n = 2-5	Oligomate 50	15 000	β-galactosidasas
Lactulosa Gal-Glc	-	MLS-50	20 000	Catalizador básico

La obtención de FOS se lleva a cabo mediante la síntesis enzimática a partir de sacarosa. Las enzimas más empleadas para la obtención industrial de FOS son las fructosiltransferasas más concretamente las sacarosa fructosiltransferasas (EC 2.4.1.99) y las β-fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26). La reacción de transfructosilación mediada por estas enzimas tiene lugar en dos pasos (13) formándose un intermedio fructosil-enzima por unión covalente de una molécula de fructosa al centro activo de la enzima y liberándose una molécula de glucosa. En el segundo paso se produce un ataque nucleofílico por un carbohidrato que actúa como molécula aceptora del fructosilo dando lugar a la síntesis del FOS correspondiente. En caso de que el nucleófilo sea una molécula de agua se forma la fructosa. La preferencia por una molécula de agua o de carbohidrato como molécula aceptora viene determinada por la tasa transferencia/hidrólisis de la enzima. Así se buscan enzimas con elevada tasa de transferencia/hidrólisis.

La mayoría de los FOS que se encuentran en el mercado son de tipo inulina tal como se observa en la Tabla 2 recomendándose un consumo diario de 10 g/ día (14).

Las levansacarasas (EC. 2.4.1.10) son enzimas que pertenecen a la familia de las hexosiltransferasas y que se encuentran en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, *Microbacterium laevaniformans* o *Bacillus licheniformis* (15-17). También son conocidas como β-26-fructosiltransferasas porque catalizan la formación de levano un homopolímero de fructosa con enlaces β(2→6) con alguna ramificación β(2→1) (Figura 3) (18). El levano tiene aplicaciones en la industria alimentaria farmacéutica y cosmética además de ser un buen agente antitumoral debido a sus propiedades físicas (19). Aparte de la formación del levano las levansacarasas (LEV) producen FOS como se muestra en la Figura 3.

Los FOS producidos por LEV son el producto de la transfructosilación de un grupo fructosilo a una molécula de sacarosa o a otro FOS respondiendo a la fórmula GF_n con n de 1 a 10. El tipo de enlace glicosílico que se forma entre las fructosas es principalmente del tipo β(2→6) produciendo entonces 6-kestosa y otros FOS de la misma familia (Figura 3). Sin embargo también se ha descrito la formación de otros FOS como la 1-kestosa y el resto de FOS de tipo inulina neokestosa blastosa etc. (Figura 3) por parte de algunas levansacarasas incluyendo la de *Z. mobilis* (20). Algunas levansacarasas también presentan actividad hidrolítica sobre el levano produciendo moléculas de fructosa levansiosa sacarosa oligómeros del levano o levano de bajo peso molecular (21).

La inmovilización de las enzimas productoras de FOS es deseable debido a la creciente demanda de este tipo de productos por la industria y los consumidores. La inmovilización de enzimas presenta una serie de ventajas frente a la utilización de enzimas solubles: aumenta la estabilidad de la enzima favorece la recuperación del producto y disminuye el coste total del proceso ya que el biocatalizador se puede reutilizar. Hay diferentes maneras de inmovilizar enzimas: por atrapamiento por adsorción en superficies por enlaces covalentes a un soporte o por enlaces covalentes entre ellas mismas para formar agregados.

La inmovilización por enlaces covalentes es más estable y reproducible que la inmovilización por adsorción o atrapamiento. Sin embargo presenta la desventaja de que puede afectar a la estructura de la enzima al interactuar con el soporte. Además muchas veces los tipos de enlaces que se forman requieren condiciones de reacción que no son favorables para la enzima. Por ejemplo para la formación de enlaces de tipo base de Schiff entre un aldehído de un soporte y un grupo amino de una enzima se requiere que el pH de la reacción sea de 10. A ese pH muchas enzimas pierden irreversiblemente su actividad.

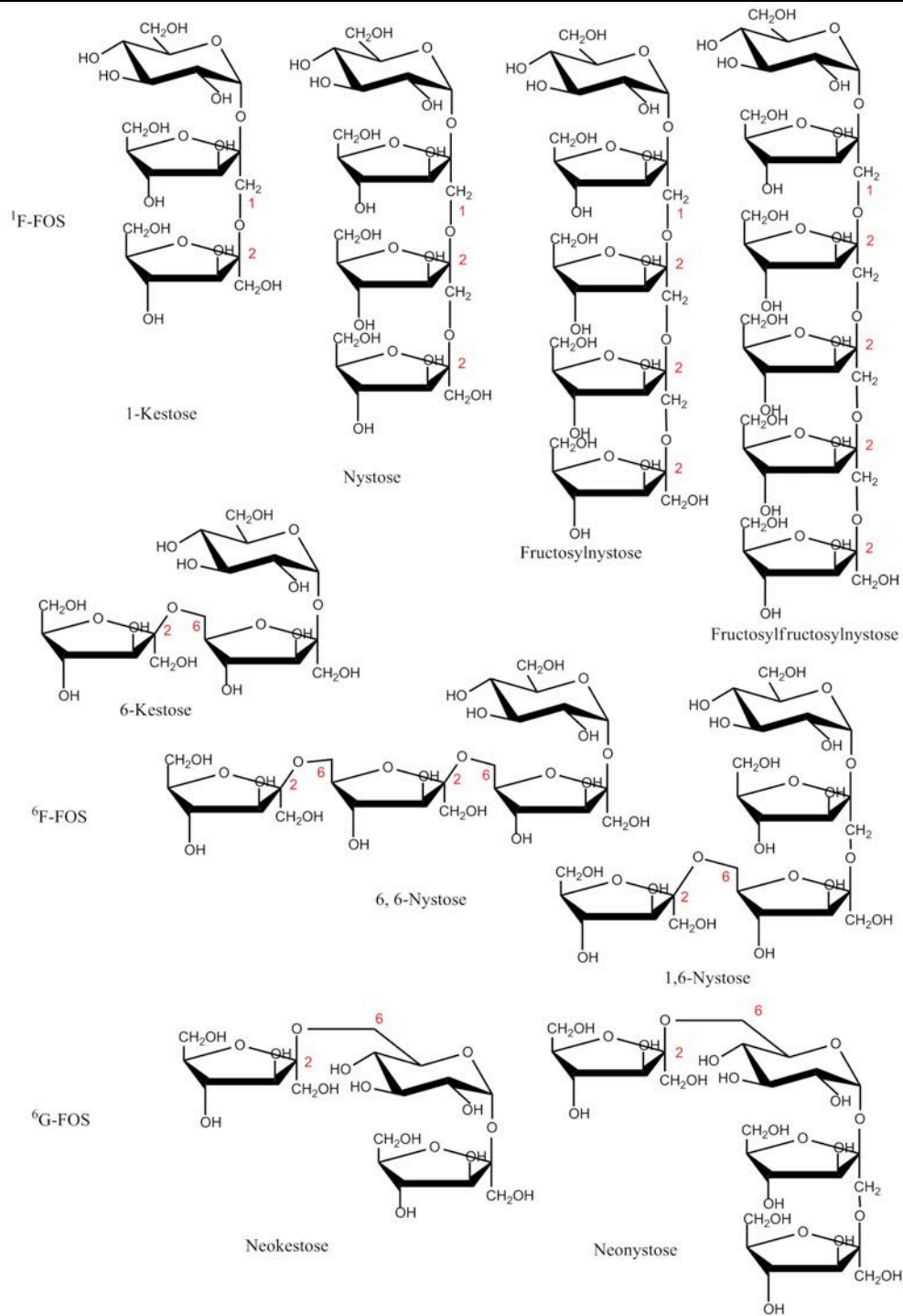
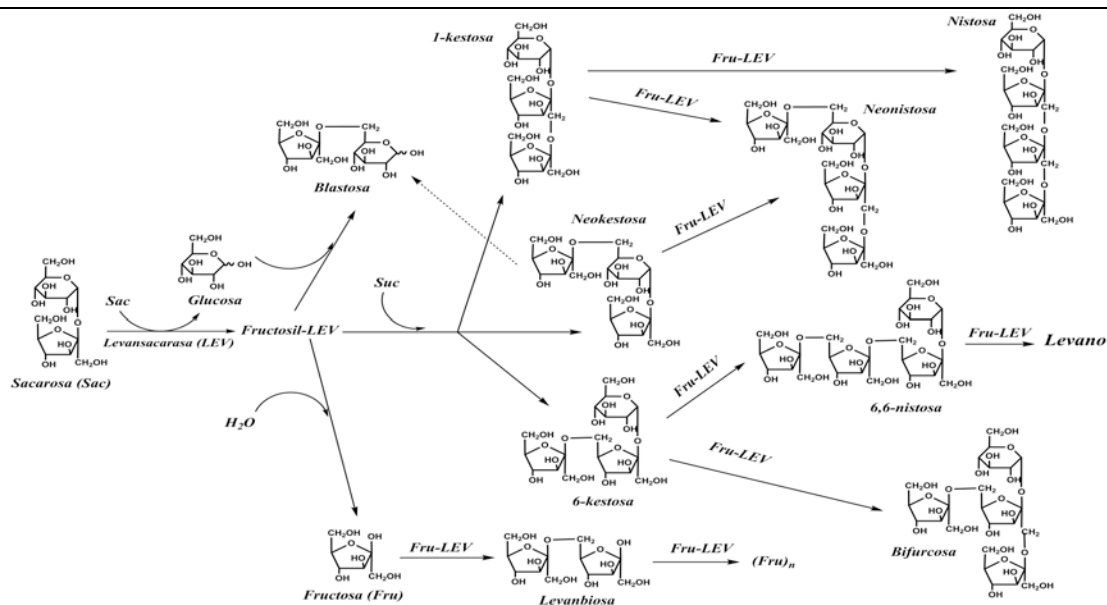


Figura 2. Estructura de los fructooligosacáridos. **A** Serie de $^1\text{F-FOS}$ con enlaces $\beta(1\rightarrow2)$ entre fructosas. **B**. Serie de $^6\text{F-FOS}$ con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ entre fructosas. **C**. Serie de $^6\text{G-FOS}$ con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ entre fructosa y glucosa.

Tabla 2. Prebióticos con estructura tipo inulina comercializados actualmente.

Prebiótico	Nombre comercial	Empresa	Método de obtención
Inulina	Raftiline®	Beneo Orafti (Bélgica)	Extracción a partir de achicoria
	Frutafit®	Sensus (Holanda)	
	Fibruline®	Cosucra (Bélgica)	
Oligofructosa	Raftilose®	Beneo Orafti	Hidrólisis parcial de inulina
	Fructalose®	Sensus	
	Fibrulose®	Cosucra	
FOS	Actilight®	Beghin Meiji (Japón) Tereos (Francia)	Síntesis enzimática a partir de sacarosa

**Figura 3.** Reacciones catalizadas por las levansacarasa.

Ya que las principales industrias consumidoras de FOS son la alimentaria y la farmacéutica las técnicas por las que se producen los FOS tienen que ser adecuadas para el consumo humano evitando el uso de disolventes orgánicos o de sustancias tóxicas. La inmovilización por atrapamiento en geles de alginato cálcico ha sido reconocida como apta para el consumo humano (GRAS *Generally Recognized as Safe*) y se usa ampliamente en la conocida como gastronomía molecular. Sin embargo una de las desventajas de esta técnica es que si la enzima no es lo suficientemente grande puede lixiviar de las esferas de alginato. La levansacarasa de *Z. mobilis* tiene una propiedad descrita por Goldman *et al.* (22) por la cual a valores de pH por debajo de 5.0 forma microfibras que aumentan su peso molecular pudiendo evitar así su lixiviación. Otra estrategia para aumentar el tamaño de las proteínas es entrecruzarlas con glutaraldehído o más recientemente con transglutaminasas (TG). Las TGs son enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la formación de enlaces covalentes entre grupos amino libres y el grupo γ -carboxiamida de las proteínas o de una glutamina de una

proteína. Los productos entrecruzados normalmente con alto peso molecular son muy resistentes al esfuerzo mecánico y a la degradación proteolítica (23). Las TGs ya se han usado para inmovilizar enzimas pero principalmente para unir covalentemente las enzimas a una matriz (24). Las TGs también son GRAS y se utilizan en la industria alimentaria para el procesamiento de carne pescado y lácteos.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la enzima levansacarasa de *Zymomonas mobilis* estudiar la síntesis enzimática de fructooligosacáridos catalizada por dicha enzima y optimizar la reacción para su uso en la industria mediante estrategias de inmovilización.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Enzimas y reactivos

La enzima levansacarasa de *Zymomonas mobilis* se adquirió como un preparado comercial de extracto extracelular en polvo de Amano (Japón). Los azúcares sacarosa glucosa fructosa 1-kestosa y nistosa eran de Sigma. La 6-kestosa la neokestosa y la blastosa fueron aisladas e identificadas previamente en el laboratorio. La

transglutaminasa se compró a la empresa japonesa Ajinomoto con el nombre comercial de Activa WM. El alginato sódico (Protanal LF 120 LS) se adquirió de FMC BioPolymer (USA). Todos los reactivos eran de la máxima pureza disponible en el mercado.

2.2. Caracterización de la enzima

La actividad catalítica de la preparación enzimática se determinó con el método del ácido 35-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores descrito por Miller (25) con sacarosa 100 g/l como sustrato. La actividad (U/mg) se definió como los μmol de azúcares reductores producidos en 1 minuto por miligramo de biocatalizador sólido comercial. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford (26) con el reactivo de Bio-Rad. El peso molecular de la proteína se estimó analizando la preparación enzimática en un gel de poliacrilamida 10% con SDS teñido con Protoblue™ Safe (National Diagnosis) y comparando el tamaño de la banda principal con marcadores de peso molecular de proteínas (Novagen). La transferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad) se realizó con el Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). La membrana se tiñó con Coomassie y las bandas de interés se cortaron y se enviaron a un laboratorio externo para los análisis de secuenciación del dominio N-terminal.

Se calcularon las condiciones óptimas de pH y temperatura en términos de actividad y estabilidad. Para la estabilidad frente al pH se prepararon las siguientes soluciones tampón: acetato sódico 50 mM a pH 3.0 3.6 4.0 4.4 y 5.0; y fosfato sódico 50 mM a pH 5.0 6.0 7.0 y 8.0. La enzima se incubó durante 24 h a 35°C en cada uno de los tampones y se midió la actividad residual con el método del DNS. Para el pH óptimo la actividad en sacarosa 100 g/l (1 ml) se midió a 35°C durante 20 min en los tampones descritos previamente. Posteriormente se midió la actividad por el método del DNS. Para medir la estabilidad frente a la temperatura la enzima se incubó durante 1 h a diferentes temperaturas entre 4-75°C y a pH 5.0 y la actividad residual se midió por el método del DNS. Para determinar la temperatura óptima se incubaron reacciones de 1 ml con sacarosa 100 g/l a diferentes temperaturas (25-75°C) y pH 5.0. La actividad de cada una de las reacciones se midió por el método del DNS.

2.3. Identificación y cuantificación de los productos de reacción

La identificación de los productos de la reacción de la levansacarasa con sacarosa como sustrato se llevó a cabo

mediante cromatografía de intercambio aniónico con un detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). Los oligosacáridos se analizaron empleando la columna CarboPack PA1 y los oligosacáridos y polisacáridos con la CarboPack PA200. Cinco unidades de levansacarasa (soluble o inmovilizada) por ml de reacción se añadieron a una solución de sacarosa 600 g/l en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.6 y se incubó a 40°C con agitación suave. Se tomaron muestras a diferentes tiempos que fueron inactivadas con Na_2CO_3 0.4 M filtradas en tubos de centrífuga con filtros de celulosa (0.45 μm National Scientific) y diluidas con agua antes de ser inyectadas en el equipo cromatográfico. Las fases móviles utilizadas para cada columna se muestran en la Tabla 3. Sólo fue posible la cuantificación de aquellos productos de los que se disponía del estándar correspondiente para realizar una curva de calibrado. La concentración de los productos desconocidos se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial de sacarosa y la suma de los productos conocidos. La actividad hidrolítica se determinó a partir de la cantidad de fructosa libre. La actividad de transfructosilación se calculó con la diferencia entre las cantidades de glucosa y fructosa libres. La tasa de transfructosilación/ hidrólisis se definió como el cociente entre ambas actividades.

Algunos de los productos de reacción desconocidos se purificaron mediante HPLC semipreparativa con una bomba Delta 600 (Waters) y un detector de índice de refracción (Varian). La columna semipreparativa era una Kromasil NH_2 5 μm (250 x 10 mm) y la fase móvil era acetonitrilo:agua 68:32 (v/v). Los productos aislados se enviaron a un laboratorio externo para los análisis de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

2.4. Entrecruzamiento de la enzima con transglutaminasa (TG)

Para el entrecruzamiento de LEV se añadieron diferentes cantidades de transglutaminasa (100 U/g) a una solución de LEV y se incubaron durante 1 h a 35°C con agitación suave. Los productos del entrecruzamiento se visualizaron electroforéticamente en condiciones nativas y desnaturalizantes. La presencia de actividad se determinó con el reactivo cloruro de 235-tripheniltetrazolio (TTC) tras una incubación en sacarosa siguiendo el protocolo descrito por Mukasa *et al.* (27). Las reacciones se dejaron toda la noche a 4°C para observar la precipitación de conglomerados de alto peso molecular.

Tabla 3. Composición de la fase móvil para HPAEC-PAD. A NaOH 200 mM; B agua; C acetato sódico (AcONa) 200 mM; D AcONa 320 mM en NaOH 100 mM.

CarboPack PA1					CarboPack PA200				
t (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Concentración	t (min)	A (%)	B (%)	D (%)	Concentración
0	10	90	0	20 mM NaOH	0	50	50	0	100 mM NaOH
13	10	90	0	20 mM NaOH	15	25	25	50	100 mM NaOH + 160 mM AcONa
20	50	30	20	100 mM NaOH + 40 mM AcONa	50	0	0	100	100 mM NaOH + 320 mM AcONa
30	50	30	20	100 mM NaOH + 40 mM AcONa	85	0	0	100	100 mM NaOH + 320 mM AcONa
35	50	0	50	100 mM NaOH + 100 mM AcONa	86	50	50	0	100 mM NaOH
37	50	0	50	100 mM NaOH + 100 mM AcONa	95	50	50	0	100 mM NaOH
40	10	90	0	20 mM NaOH					
50	10	90	0	20 mM NaOH					

2.5. Inmovilización

La enzima se inmovilizó por atrapamiento en alginato cálcico goteando una disolución 1:1 de enzima:alginato sódico 4% (p/v) sobre una disolución de CaCl₂ 200 mM. Este protocolo se siguió para la inmovilización de LEV a pH 4.0 a pH 5.6 y de LEV tras el entrecruzamiento con TG. El rendimiento de la inmovilización se calculó midiendo la actividad y la cantidad de proteína presente en las distintas soluciones de inmovilización y comparándolo con los datos de la solución enzimática inicial. Se utilizaron diferentes concentraciones iniciales de LEV y se determinó que la concentración más eficiente era 100 mg/ml de preparación enzimática ya que algo de la actividad se perdía con la incubación con TG.

Las esferas de alginato se deshidrataron mediante aireación forzada para formar “DALGEEs” (*Dry ALGinate Entrapped Enzymes*) (28) y se estudió su actividad y su estabilidad. El ensayo de lixiviación consistió en ciclos secuenciales de reacciones en batch y de lavados con sacarosa: los DALGEEs se incubaron con 500 µl de sacarosa 600 g/l en las condiciones óptimas de reacción durante 20 min a 40°C y 600 rpm durante cada ciclo de reacción. El medio de reacción se extrajo para analizar su actividad residual mediante el método del DNS y los biocatalizadores se lavaron dos veces con sacarosa fría antes de comenzar otro ciclo.

2.6. Visualización de los biocatalizadores con microscopía electrónica de barrido (SEM)

La visualización fue posible con la ayuda del Laboratorio de Técnicas No Destructivas del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC). Las esferas de alginato se observaron con el FEI INSPECT un SEM que puede trabajar a bajo vacío (0.08 a 0.60 torr) y que dispone de un detector de electrones secundarios y otro de *backscattering*. Tanto las esferas de alginato como los DALGEEs se analizaron con el FEI QUANTA 200 un

SEM que puede operar a tres modos de vacío: alto vacío bajo vacío (0.08 a 1 torr) y a condiciones ambientales o ESEM (1 a 20 torr) con un detector de electrones secundarios y otro de *backscattering*. Las esferas de alginato se analizaron en condiciones ambientales y los DALGEEs a bajo vacío porque la resolución era mejor. Este microscopio estaba acoplado a un detector de masas que funcionaba al trabajar a bajo vacío y que podía analizar fácilmente cualquier porción de la muestra.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad catalítica y condiciones óptimas de la enzima soluble

Se estudió el efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de la enzima soluble (Figura 4). Aunque observando las gráficas se puede comprobar que la temperatura óptima de LEV era 54°C la enzima no era estable a temperaturas superiores a 44°C (Figura 4A). En cuanto al pH el valor óptimo y el de máxima estabilidad era el mismo pH 5.6 (Figura 4B). Por lo tanto las condiciones seleccionadas para operar con la enzima soluble se fijaron en 40°C y pH 5.6. Bajo estas condiciones la actividad catalítica de enzima era 6.68 U por mg de preparado comercial. La preparación enzimática tenía un contenido en proteína del 6.25% (p/p).

El peso molecular de la levansacarasa suponiendo que ésta es la banda mayoritaria era aproximadamente de 45 kDa según SDS-PAGE (Figura 5A flecha roja). Aparte de la banda mayoritaria se podían observar otras proteínas contaminantes en la preparación enzimática. Para dilucidar cuál de las bandas tenía actividad se hizo un zimograma y se encontraron tres bandas capaces de producir azúcares reductores (Figura 5B carril 1). Un gel en condiciones nativas se transfirió a una membrana de PVDF se recortaron las bandas de interés y se enviaron a un laboratorio externo (*Microbial Interactions and Processes Research Group HZI Alemania*) para la secuenciación de su dominio N-terminal. Los resultados mostraron que las

tres bandas correspondían a secuencias de levansacarasa por lo que se deduce que pueden ser isoformas de la misma. Con esto se concluye que toda la actividad que

presenta la preparación enzimática de Amano® se puede atribuir a la enzima levansacarasa de *Z. mobilis*.

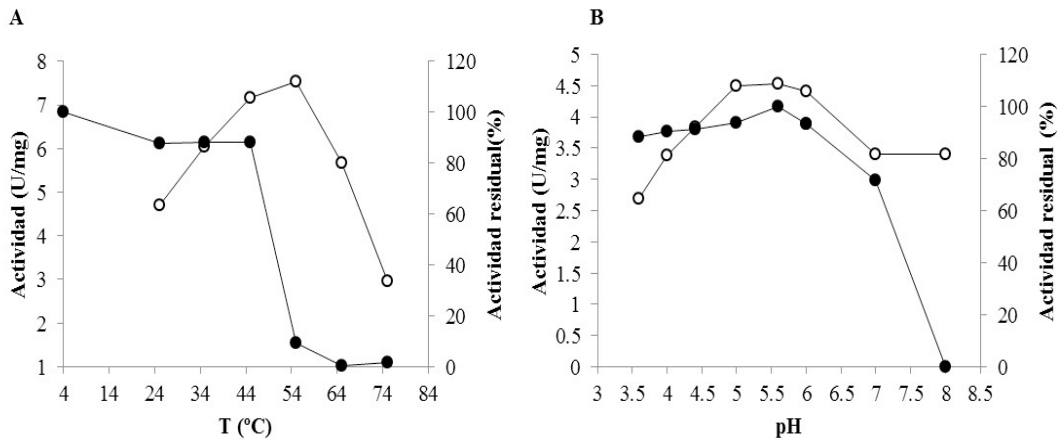


Figura 4. Temperatura y pH óptimos. **A.** Estabilidad (círculos negros) expresada como actividad residual tras 24 h de incubación y temperatura óptima (círculos blancos) en U/mg de preparado comercial. **B.** Estabilidad (círculos negros) expresada como actividad residual tras 1 h de reacción y pH óptimo (círculos blancos) en U/mg de preparado comercial.

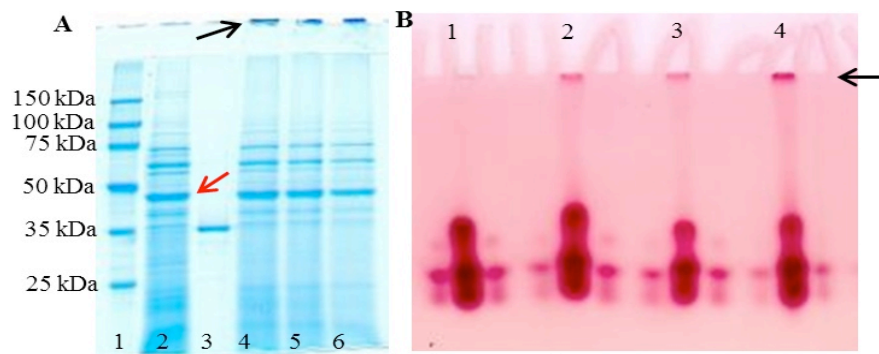


Figura 5. SDS-PAGE y actividad en gel (zimograma). **A.** SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: LEV. Carril 3: TG. Carril 4: LEV + 10 U/ml TG. Carril 5: LEV + 20 U/ml TG. Carril 6: LEV + 40 U/ml TG. **B.** Zimograma. Carril 1: LEV. Carril 2: LEV + 10 U/ml TG. Carril 3: LEV + 20 U/ml TG. Carril 4: LEV + 40 U/ml TG.

3.2. Producción de fructooligosacáridos por la levansacarasa soluble

Se analizó una reacción con sacarosa 600 g/l y 5 U/ml de LEV soluble en tampón acetato 50 mM pH 5.6. Con la ayuda de estándares se identificaron los oligosacáridos 1-kestosa 6-kestosa blastosa neokestosa y nistosa mediante HPAEC-PAD con la columna CarboPack PA1 (Figura 6A). Se formaban también otros productos para los que no

disponíamos de estándares. El pico 13 se purificó por HPLC semipreparativa y se envió a un servicio externo para la identificación por masas y RMN. Los resultados de espectrometría de masas mostraron que el pico 13 era un tetrasacárido (MW = 666 g/mol). Finalmente los resultados de RMN confirmaron que se trataba de la 66-nistosa.

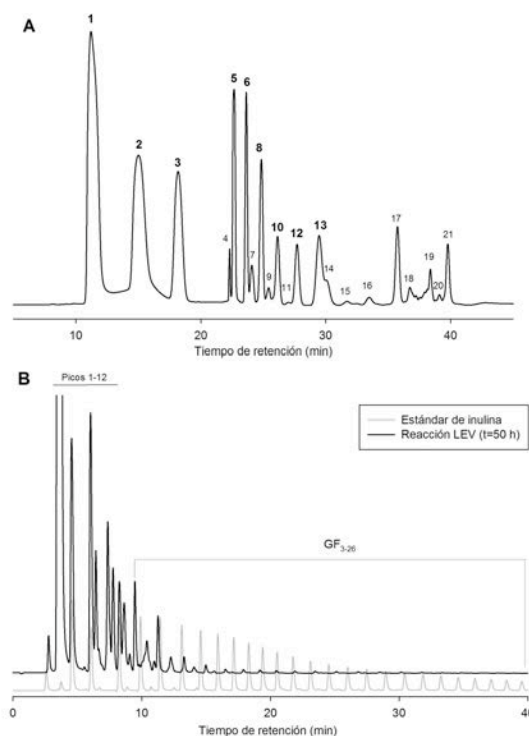


Figura 6. Cromatograma de los FOS producidos por LEV soluble. Condiciones de reacción: 5 U/ml de LEV soluble y 600 g/l de sacarosa en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.6 **A.** HPAEC-PAD con columna CarboPack PA1 19 h de reacción. **B.** HPAEC-PAD con columna CarboPack PA200 50 h de reacción. Línea gris: estándar de inulina. 1: glucosa; 2: fructosa; 3: sacarosa; 5: 1-kestosa; 6: blastosa; 8: 6-kestosa; 10: neokestosa; 12: nistosa; 13: 66-nistosa.

La producción de FOS por la enzima soluble alcanzó su máximo cuando el 85% de la sacarosa se había consumido y la tasa de transfructosilación/hidrólisis era 2.2. El FOS más abundante en la reacción era 6-kestosa seguido de 1-kestosa y neokestosa (Figura 7 triángulos). Además el pico de blastosa era bastante importante en la reacción pero no disponíamos de cantidad suficiente para cuantificarlo.

Aparte de estos FOS se puede observar en los cromatogramas que la enzima es capaz de formar otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización que no se pueden identificar. Dado que uno de los productos descritos para la levansacarasa es el levano se intentaron visualizar oligosacáridos cada vez más largos. Para ello se utilizó HPAEC-PAD con la columna CarboPack PA200.

Como estándar para aproximar el grado de polimerización se utilizó inulina (Raftiline® Orafti) (Figura 6B cromatograma gris) donde se puede observar toda la serie de la inulina desde GF2 hasta GF60. Las mismas muestras recogidas para el análisis de los FOS se analizaron con la nueva columna (Figura 6B). Al ser una columna más resolutive además de los FOS identificados en el experimento anterior también se pudieron identificar la difructosa (F2) fructosilnística (GF4) y la neonística; además de diversos productos de la serie de la inulina

(GF_n y F_n). En la Figura 6B se puede observar cómo van apareciendo picos de azúcares cada vez más largos tanto de la serie de la inulina (¹F-FOS) como otros sin identificar que probablemente pertenezcan la serie ⁶F-FOS. Sin embargo el levano de peso molecular mucho más elevado no se pudo visualizar con este tipo de cromatografía.

3.3. Entrecruzamiento de la levansacarasa con transglutaminasa

Debido al reducido tamaño de LEV para su inmovilización por atrapamiento la enzima se entrecruzó usando la enzima transglutaminasa. Se probaron diferentes proporciones de ambas enzimas y LEV conservaba altos niveles de actividad (medida por DNS) incluso tras la adición de grandes cantidades de TG (resultados no incluidos). Para analizar el tamaño de los agregados las reacciones se estudiaron electroforéticamente. Aparecieron las mismas bandas que en el carril de LEV pero además se podía ver un conglomerado que no era capaz de penetrar en el gel (Figura 5A flecha negra). Para comprobar si esa banda era activa se estudió la actividad con un zimograma (Figura 5B carriles 2 3 y 4 flecha negra). La banda del agregado formado por entrecruzamiento era una vez más incapaz de entrar en el gel pero se pudo detectar actividad. Sin embargo una cantidad importante de LEV quedaba sin entrecruzar incluso tras el tratamiento con 40 U/ml de TG. También se pudo observar la precipitación de proteínas de

alto peso molecular cuando los eppendorfs con las reacciones se dejaban por la noche en el frigorífico (Figura

8A).

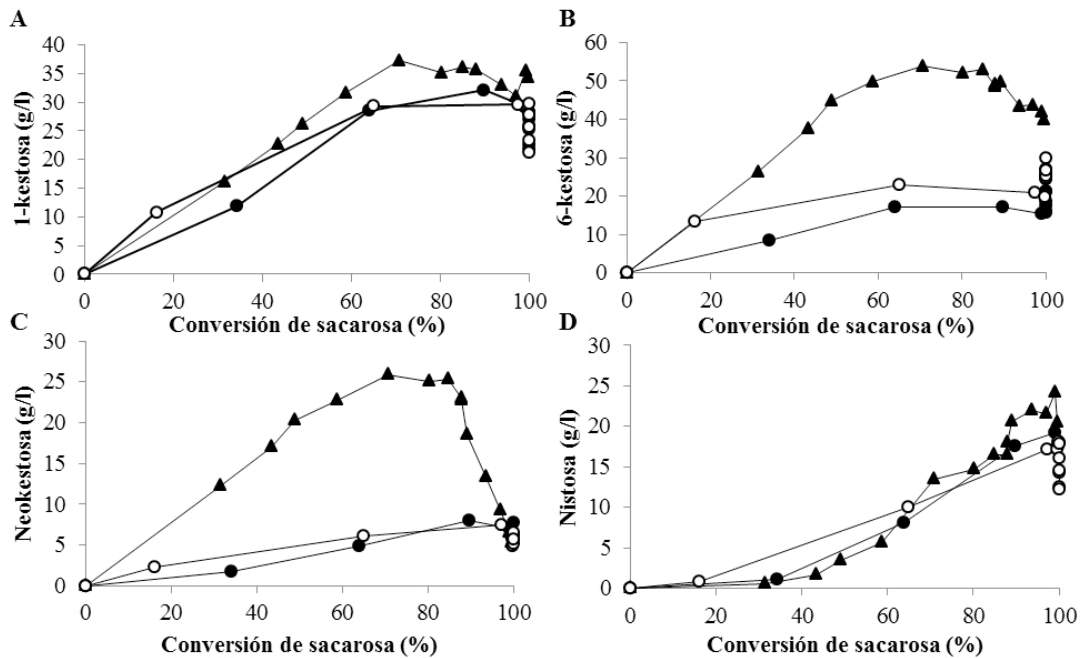


Figura 7. Comparación de la síntesis de FOS por LEV soluble (triángulos) LEV inmovilizada (círculos negros) y LEV inmovilizada previamente entrecruzada con TG (círculos blancos). **A.** 1-kestosa. **B.** 6-kestosa. **C.** Neokestosa. **D.** Nistosa.

3.4. Cambio de la estructura cuaternaria de LEV con el pH

Según Goldman y cols. (22) la levansacarasa de *Z. mobilis* existe en dos formas dependiendo del pH. A valores de pH por debajo de 5.0 forma microfibras que aumentan su tamaño mientras que a pH por encima de 5.0 la enzima se encuentra principalmente en forma de dímero soluble. Para observar este efecto se incubó LEV en tampones a diferentes pH y se dejaron toda la noche. Se observaron precipitados a pH 4.0 y en menor medida a pH 5.0 (Figura 8B) aunque en ambos casos significativamente menos que tras el entrecruzamiento con TG. También se incubó LEV sola en las mismas condiciones para comparar los resultados.

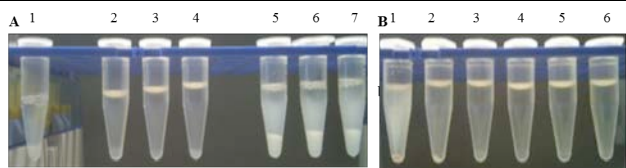


Figura 8. Precipitación de agregados de alto peso molecular. **A.** Precipitación tras el entrecruzamiento con TG. 1: LEV 20 mg/ml. 2 3 y 4: LEV 20 mg/ml tras 1 h de reacción con 1 5 y 10 U/ml de TG respectivamente. 5 6 y 7: LEV 20 mg/ml tras 2 h de reacción con 10 20 y 40 U/ml de TG respectivamente. **B.** Precipitación de microfibras de LEV formadas a bajo pH. 1 2 y 3: LEV 20 mg/ml en tampón acetato pH 4.0 5.0 y 6.0 respectivamente. 4 5 y 6: LEV 20 mg/ml en tampón fosfato pH 6.0 7.0 y 8.0 respectivamente.

3.5. Inmovilización

La enzima LEV se inmovilizó siguiendo las dos estrategias descritas para aumentar su tamaño: entrecruzamiento con TG y ajustando el pH por debajo de 5.0. La enzima también se inmovilizó en su forma soluble a pH 5.6 para comparar los resultados. Primero se inmovilizaron por atrapamiento para formar esferas de alginato (Figura 11E izq.). Aunque el rendimiento de la inmovilización fue superior al 90% (Tabla 4) estas esferas demostraron no mostraron una gran estabilidad operacional en batch; las tres estrategias perdían la enzima durante los primeros 4 ciclos de reacción (Figura 9A). Para intentar evitar el problema de la lixiviación las esferas de alginato se secaron para formar DALGEEs (*Dry ALGinate Entrapped Enzymes*) (Figura 11E dcha.). Esta estrategia resultó ser más eficaz. El tamaño de los DALGEEs es aproximadamente un tercio de las bolas de alginato (Figura 11). Los mejores resultados de actividad frente a lixiviación se obtuvieron con la estrategia de la TG. Tras 15 ciclos de reacción el biocatalizador conservaba el 85% de su actividad inicial (Figura 9B) es decir aproximadamente 18 U por gramo de biocatalizador. El aumento de actividad tras el primer ciclo de reacción se puede explicar por la hidratación de los DALGEEs al entrar en contacto con el medio líquido de la reacción y por lo tanto la ligera relajación de la red de alginato que facilita el intercambio entre sustratos y productos. Los DALGEEs a pH 4.0 tenían más actividad al principio pero al estudiar la lixiviación con sacarosa 600 g/l a pH 4.0 la sacarosa daba señal en el ensayo de DNS probablemente

como consecuencia de una hidrólisis ácida haciendo imposible el análisis de los datos (resultados no incluidos).

Tabla 4. Rendimiento de la inmovilización de LEV en alginato cálcico. La actividad se midió en dos puntos durante la inmovilización: tras la incubación con TG y tras la inmovilización.

	Rendimiento de incubación *	Rendimiento de inmovilización	Rendimiento total
LEV	58%	94%	55%
LEV + TG	59%	92%	54%

* Tras 2 h de incubación con TG a 35°C pH 5.6 600 rpm

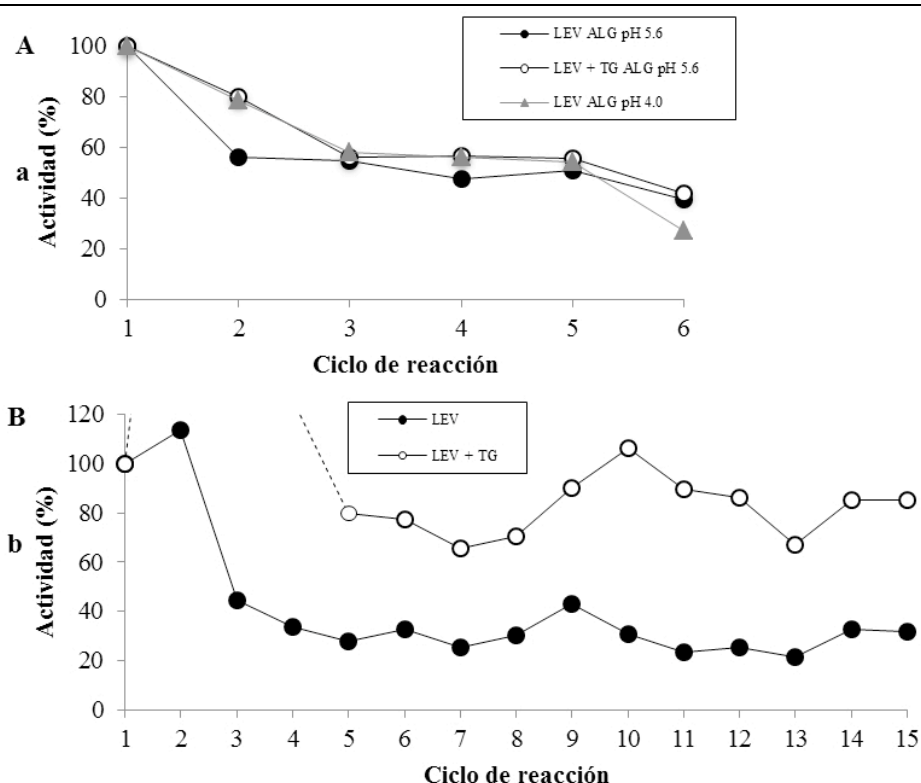


Figura 9. Estabilidad operacional de los biocatalizadores de alginato. **A.** Actividad residual de las bolas de alginato de LEV inmovilizada a pH 4.0 a pH 5.6 y LEV inmovilizada previamente entrecruzada con TG a pH 5.6 tras varios ciclos de reacción con sacarosa 600 g/l. **B.** Actividad residual de los DALGEEs de LEV a pH 5.6 y LEV + TG tras varios ciclos de reacción con sacarosa 600 g/l.

3.5. Producción de fructooligosacáridos por la levansacarasa inmovilizada

Una vez que la enzima estuvo inmovilizada se estudiaron reacciones en las mismas condiciones que con la enzima soluble y las muestras se analizaron por HPAEC-PAD. Básicamente se formaron los mismos productos que con la enzima soluble solo que en distinta proporción (Figura 7 círculos negros y blancos). Además las reacciones con biocatalizadores inmovilizados parecían ir más rápidas a pesar de haber puesto las mismas unidades. Esto pudo ser causado por el efecto observado en el ensayo de lixiviación por el cual la actividad aumentaba tras el primer ciclo de reacción.

Aunque inicialmente ambas reacciones (con la enzima soluble e inmovilizada) se estudiaron con el mismo número de unidades de LEV por ml este efecto puede haber causado que la actividad de los DALGEEs fuera en

realidad mayor que la que se calcula con un solo ensayo de DNS. Sin embargo lo que parece bastante claro es que la enzima es capaz de consumir casi toda la sacarosa presente en la reacción y permanece activa incluso después de 129 h de reacción (datos no mostrados). No hubo diferencias significativas entre los productos formados por LEV inmovilizada sola y LEV previamente entrecruzada con TG aunque se pudo observar un ligero aumento en la producción de FOS en la estrategia con TG que tenían una tasa de transfructosilación/ hidrólisis de 1.8.

La producción de FOS con LEV inmovilizada alcanzó su máximo cuando casi toda la sacarosa se había consumido (Figura 10B) y la tasa de transfructosilación hidrólisis era de 1.6. Una vez que la conversión de sacarosa fue total la concentración de 1-kestosa y neokestosa empezó a caer (Figuras 7A y 7C) mientras que la concentración de 6-kestosa parecía aumentar (Figura 7B). Esto indica que probablemente LEV está actuando

sobre la 1-kestosa produciendo oligosacáridos más largos. Estos oligosacáridos se pueden observar en los tiempos largos de retención de los cromatogramas (Figura 6) pero

como su identidad es desconocida no se puede saber su concentración exacta.

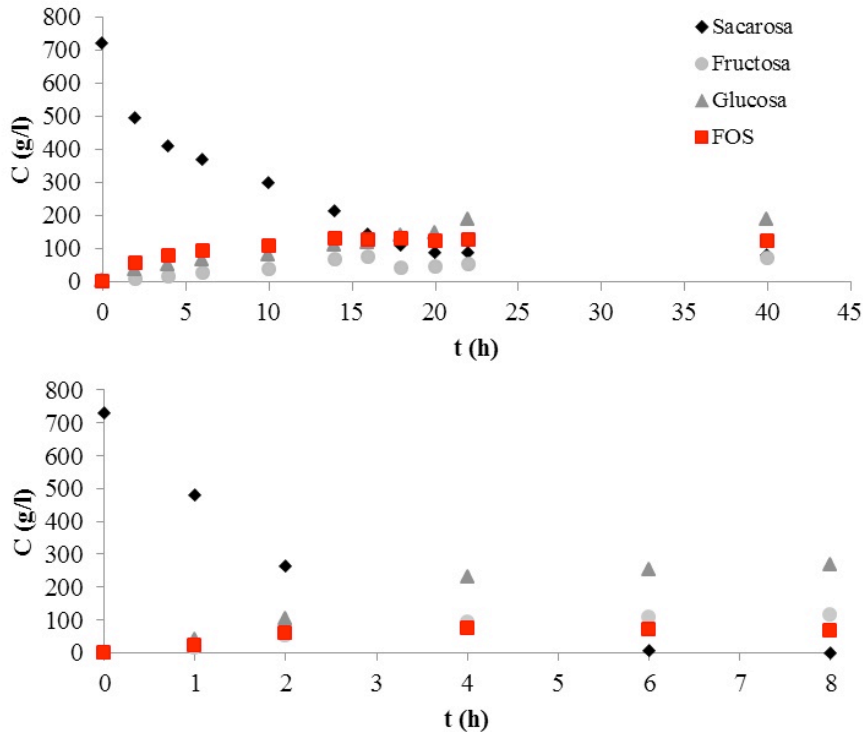


Figura 10. Variación de la concentración de sacarosa glucosa fructosa y suma de FOS conocidos frente al tiempo de reacción. Reacción con LEV soluble (primer gráfico). Reacción con LEV inmovilizada (segundo gráfico).

3.6. Visualización de los biocatalizadores mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las esferas de alginato son muy difíciles de observar con microscopía electrónica debido a su alto contenido en agua (90%). Las condiciones de alto vacío dentro de los microscopios hacen que las esferas se deshidraten y se pierda la estructura original de la red de alginato cálcico. Sin embargo con las condiciones de bajo vacío del SEM FEI INSPECT las bolas de alginato se pudieron visualizar cuando habían perdido solo un tercio de su volumen (Figura 11A) y se puede apreciar lo que parece que son los poros por los que se podría estar produciendo la difusión

de sustratos y productos. Cuando se intentó observar las bolas de alginato en condiciones ambientales la resolución no era muy buena (no se muestra la imagen).

Los DALGEEs se observaron con en un microscopio SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (Figura 11 B-D). A pesar de acercarse bastante a la superficie no se pudo detectar ningún poro. Sin embargo se pueden ver unas franjas paralelas que pueden ser producto de la deshidratación pero también nos podría estar dando una idea de la estructura interna de la red de alginato. Algunos DALGEEs presentaban cristales de NaCl y de CaCl₂ en la superficie procedentes de los tampones y disoluciones utilizados durante la inmovilización.

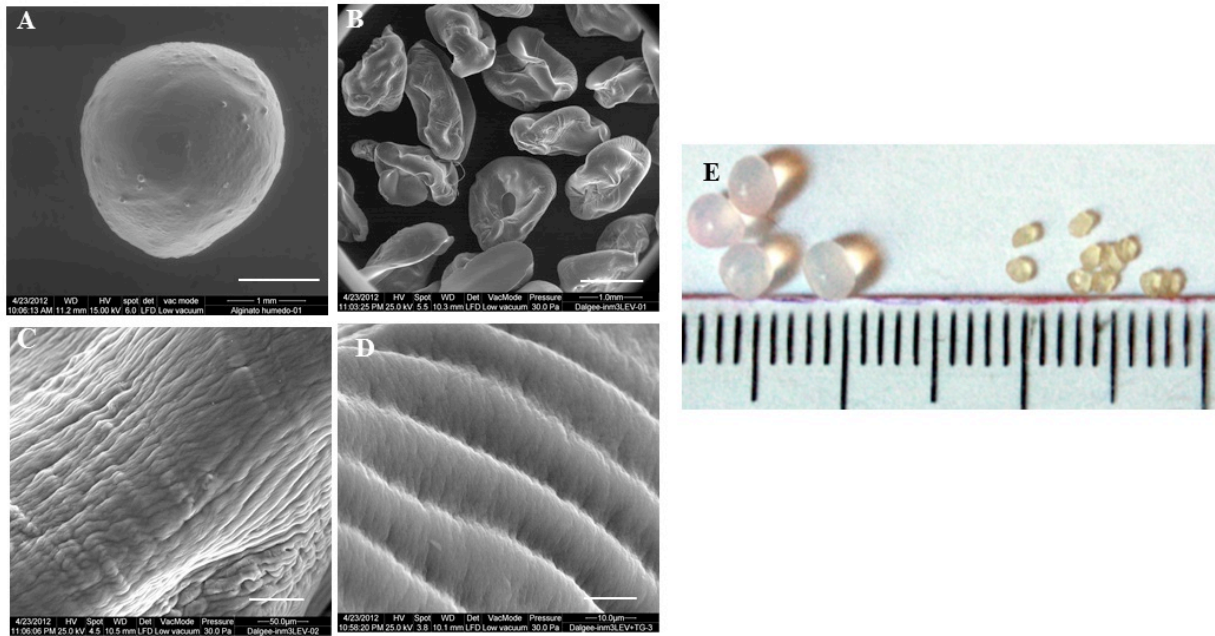


Figura 11. Visualización de las esferas de alginato y los DALGEEs. **A.** Esfera de alginato visualizada con SEM FEI INSPECT en condiciones de bajo vacío. Escala: 1 mm. **B y C.** DALGEEs de LEV visualizados con SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (30.0 Pa). Escala B: 1.0 mm. Escala C: 50.0 μm . **D.** Superficie de DALGEE de LEV entrecruzado con TG visualizado con SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (30.0 Pa). Escala: 10.0 μm . **E.** Fotografía de esferas de alginato (izq.) y DALGEEs (dcha.).

4. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en la caracterización de la levansacarasa de *Z. mobilis* parecen concordar con estudios previos sobre esta enzima (16, 20, 29, 30).

En cuanto a las tres bandas con actividad reductora de azúcares presentes en el gel de actividad se enviaron a un laboratorio externo para secuenciar su extremo N-terminal y comprobar qué clase de enzimas son probablemente las dos más importantes correspondan a las dos levansacarasas de *Z. mobilis* descritas en su genoma (números de acceso en GeneBank AAV88999.2 y AAV88998.1 (31).

En cuanto a la producción de FOS se encontró cierta discordancia entre los resultados publicados previamente y nuestros resultados. Además nunca antes se había hecho un estudio cromatográfico en detalle. Mientras que en la bibliografía la 6-kestosa está definida como el principal producto de LEV (20) encontramos que esto era verdad solo durante las primeras horas de reacción usando la enzima soluble. Por el contrario con la enzima inmovilizada el principal producto era la 1-kestosa.

También hubo diferencias en las cantidades de FOS producidas por la enzima soluble e inmovilizada. La enzima soluble sintetizaba considerablemente más 6-kestosa y neokestosa que la enzima inmovilizada. También se producía ligeramente más 1-kestosa con la enzima soluble pero no de manera significativa. Por otra parte la nistosa presentaba prácticamente la misma tasa de producción en todas las reacciones. Esto significa un

cambio de selectividad en la producción de trisacáridos cuando la enzima se inmoviliza.

En cuanto a la producción de azúcares más largos con el uso de la columna CarboPack PA200 se pudo visualizar el crecimiento de los FOS hasta un grado de polimerización de aproximadamente GF20. Muestras de tiempos más largos no mostraban tantos picos de alto grado de polimerización. Esto puede ser debido a que todo se ha transformado ya en levano de más peso molecular que no es posible visualizar por cromatografía.

Cuando la enzima se inmovilizó por atrapamiento en alginato cálcico se observaba lixiviación incluso cuando LEV había sido entrecruzada con TG. Sin embargo con la estrategia de los DALGEEs previo entrecruzamiento con TG se conservaba un 85% de la actividad tras 15 ciclos de reacción. Siempre se obtenía el mismo perfil de actividad en el que el segundo ciclo de reacción daba más actividad que el primero. Una posible explicación a este fenómeno es que cuando las esferas se secan y se quedan compactas algunas moléculas de enzimas no son accesibles para el sustrato. Cuando los DALGEEs se incuban en una disolución de sacarosa en el primer ciclo se rehidratan ligeramente haciendo la red de inmovilización más flexible y facilitado la difusión de sustratos y productos. Es interesante comprobar que los DALGEEs no vuelven a su forma original de esferas de alginato totalmente hidratadas debido a la baja actividad del agua (a_w) de la disolución de sacarosa empleada.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos la enzima levansacarasa es muy adecuada para la producción a escala industrial de FOS. A diferencia de otras enzimas relacionadas (p.ej. β -fructofuranosidasas) la levansacarasa produce una mezcla compleja de productos que podrían tener efectos sinérgicos en cuanto a sus propiedades prebióticas. La amplia gama de FOS producidos por esta enzima abre posibilidades más allá de los FOS de la familia de la inulina en los que están centrados la mayor parte de los productos actualmente comercializados.

De las estrategias de inmovilización ensayadas la mejor fue el entrecruzamiento con TG siguiendo la metodología de los DALGEEs aunque una cantidad importante de LEV quedara sin entrecruzar. Esta estrategia no solo no afectó a la actividad de LEV sino que parecía aumentar ligeramente la producción de FOS en comparación con la enzima inmovilizada sin entrecruzar. El cambio en la selectividad puede ser interesante si se requiere la producción de un tipo de FOS en particular como por ejemplo la 1-kestosa o la nistosa.

El método de inmovilización propuesto que combina atrapamiento en alginato cálcico con entrecruzamiento con transglutaminasa es muy interesante para la producción de FOS y su aplicación a la industria alimentaria debido a que todos los materiales son aptos para el consumo humano. La optimización de esta técnica supondría una fácil producción de FOS prebióticos a partir de un sustrato barato y fácilmente accesible como es la sacarosa.

También sería interesante optimizar la producción del polisacárido sintetizado por la levansacarasa (levano) debido a su capacidad antitumoral (19) anticolesterolemica antioxidante (32) y antidiabética entre otras. Dichos procesos permitirían reducir el elevado precio que tiene el levano a día de hoy.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2010-20508-C04-01) y otro del Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2013-48779-C4-1-R). Agradecemos a Amano (Japón) por su amable donación de la enzima levansacarasa.

7. REFERENCES

1. Fuller R. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 1989; 66: 365-78.
2. Cummings J H, Macfarlane G T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of Applied Bacteriology* 1991; 70: 443-59.
3. Gibson G R, Rastall R A. *Prebiotics: development and application*. Chichester: John Wiley & Sons 2006.
4. Macfarlane G T, Steed H. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 104: 305-44.

5. Mayo B, Delgado S. Probióticos y salud. *Alimentación y salud* 2003; 10: 61-70.
6. Guarner F. [The colon as an organ: habitat of bacterial flora]. *Nutrición Hospitalaria* 2002; 17: 7-10.
7. Ottman N, Smidt H. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2: 104.
8. Arumugam M, Raes J. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174-80.
9. Zoppi G. Probiotics and prebiotics in the treatment of infections due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* and of imbalance of the intestinal ecosystem (dysbiosis). *Acta paediatrica* 1997; 86: 1148-50.
10. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition* 2007; 137: 830s-7s.
11. Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 1995; 125: 1401-12.
12. Plou F J, Segura A G. Application of Glycosidases and Transglycosidases in the Synthesis of Oligosaccharides. In: Polaina J, MacCabe A. Eds. Springer Netherlands; 2007: p. 9
13. Plou F J, Martín M T. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Canadian Journal of Chemistry* 2002; 80: 743-752.
14. Bouhnik Y, Raskine L. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition Journal* 2006; 5: 8.
15. Park H E, Park N H. Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32: 820-827.
16. Lyness E W, Doelle H W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology letters* 1983; 5: 345-350.
17. Chambert R, Treboul G. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 1974; 41: 285-300.
18. Han Y W. Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology* 1990; 35: 171-94.
19. Dahech I, Belghith K S. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012; 51: 329-335.
20. Bekers M, Laukevics J. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry* 2002; 38: 701-706.
21. Jang K H, Ryu E J. Levan fructotransferase from *Arthrobacter oxydans* J17-21 catalyzes the formation of the di-D-fructose dianhydride IV from levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 2635-2636.

22. Goldman D, Lavid N. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. The Journal of biological chemistry 2008; 283: 32209-32217.
23. Griffin M, Casadio R. Transglutaminases: Nature's biological glues. Biochemical Journal 2002; 368: 377-396.
24. Kamata Y, Ishikawa E. Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker. Biosciences Biotechnology and Biochemistry 1992; 56: 1323-1324.
25. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 1959; 31: 426-428.
26. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72 248-54 (1976)
27. Mukasa H, Shimamura A. Direct activity stains for glycosidase and glucosyltransferase after isoelectric focusing in horizontal polyacrylamide gel layers. Analytical Biochemistry 1982; 123.
28. Fernández-Arrojo L, Rodríguez-Colinas B. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. Process Biochemistry 2013; 48: 677-682.
29. Yanase H, Iwata M. Purification crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry 1992; 56: 1335-1337.
30. Crittenden R G, Doelle H W. Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). Applied Microbiological Biotechnology 1994; 41: 302-308.
31. Seo J S, Chong H. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. Nature Biotechnology 2005; 23: 63-8.
32. Belghith K S, Dahech I. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. International Journal of Biological Macromolecules 2012; 50: 451-8.



Sesión Inaugural del Curso Académico 2015 Orden del Día

1. Salutación del Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.
2. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2013 por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas.
3. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número, titulado «*Ciencia de doble uso: los farmacéuticos y los gases tóxicos durante la Guerra Civil Española (1936-1939)*».
4. Entrega de la Medalla Carracido en su categoría de Oro al Excmo. Sr. D. Juan Uriach Marsal.
5. Entrega de Premios del Concurso Científico 2014.
6. Clausura del Acto.

CRÓNICA DE LA SESIÓN INAUGURAL DEL CURSO ACADÉMICO 2015



Mesa de la Presidencia de izda. A dcha.): D. Juan Ramón Lacadena Calero, D. Alberto Galindo Tixaire, D. Mariano Esteban Rodríguez, D. Jesús Álvarez Fernández-Represa y D. Bartolomé Ribas Ozonas.

El 22 de enero de 2015, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió de gran solemnidad. Presidido por el Presidente de la Corporación Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, quien estuvo acompañado en la presidencia por el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo Tixaire, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez Fernández-Represa, Presidente de la Real Academia de Doctores de España; del Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero y del Secretario de la misma el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF pronunció unas palabras de salutación primero, y comentó los éxitos obtenidos por la Academia en 2014. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2014, acompañada con una dinámica presentación, en la que destacó el alto nivel científico alcanzado en las sesiones científicas de la Academia, durante el curso 2014; así como de las publicaciones, premios y distinciones concedidas a los Excmos. Sres. Académicos. Destacó el convenio firmado con la Academia de Ciencias Odontológicas (Fundación Dental Española), y con el Grupo Cofares, además de la toma de posesión como Académico de Número del Profesor Jesús Pintor Just, además de la toma de posesión como Académico de Honor del Dr. José Baselga, además de otras dos de Académicos Correspondientes y tres de Académicos extranjeros. A continuación, el Excmo. Señor Don Francisco Javier Puerto Sarmiento leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso 2015 sobre «Ciencia de doble uso: los farmacéuticos y los gases tóxicos durante la Guerra Civil Española (1936-1939)». Posteriormente, se entregó la Medalla Carracido, en su categoría de Oro al Excmo. Sr. D. Juan Uriach Marsal. Seguidamente se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia que quedó desierto por no alcanzar los trabajos presentados el nivel exigido para el mismo. Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Alcalíber-Iberoamerica, Premio Cinfa, Premio Juan Abelló, y Premio Antonio Doadrio López, para tesis doctorales, a dos jóvenes investigadores, todos ellos propuestos por las Comisiones y que la Junta de Gobierno y seguidamente la Junta General Ordinaria decidieron como

merecedores. El Acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades de Don Miquel Yllà-Catalá, expresidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña; Don Isaac Arias Santos, de la Academia de Galicia; Don Carlos González Canga-Argüelles, Presidente de la Academia de Farmacia de Castilla y León y de Don Santiago Andrés Magallón Vicepresidente de la Academia de Farmacia del Reino de Aragón. Clausuró el acto el Presidente de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2015 en nombre de S. M. el Rey.

DISCURSO DEL EXCMO. SR. PRESIDENTE, DE APERTURA DEL CURSO ACADÉMICO 2014 DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Como en años anteriores en esta época del mes de enero, iniciamos un nuevo curso Académico con la mirada puesta sobre lo que nos va a deparar este año 2015, dejando atrás los frutos cosechados en el curso anterior, pero al mismo tiempo con la tristeza de los que nos han dejado. A los Académicos que no pueden estar con nosotros, nuestro testimonio de gratitud. Hace dos años que tuve el honor de Presidir esta corporación y puedo decir que me siento muy orgulloso de todo el equipo directivo, así como de los Académicos que con sus contribuciones, observaciones y sugerencias hacen que la Academia mantenga esa excelencia a la que todos estamos comprometidos como institución de vanguardia de la ciencia farmacéutica. Pero el año anterior ha sido histórico por un evento transcendental como fue la abdicación del Rey Juan Carlos I en la persona de su hijo el Rey Felipe VI. En un gesto extraordinario, el Rey Felipe VI nos recibió a los Presidentes de las Reales Academias el 27 de Junio, pocos días después de ser nombrado Rey de España, para transmitirnos su apoyo de alto Patronazgo y sobre todo exponernos lo que se espera de nosotros, con un claro mensaje de mayor apertura de las academias hacia la sociedad. Fue un encuentro solidario hacia las Reales Academias resaltando el papel tan relevante que estas ejercen en la cultura española y de que hay que adecuarse a los nuevos tiempos, utilizando los recursos disponibles de los medios sociales para conseguir ese acercamiento y apertura hacia la sociedad.

También el año 2014 ha sido el año del Ébola, una enfermedad con una alta tasa de mortalidad, producida por un virus de la familia Filovirus, que nos ha demostrado la fragilidad de nuestro sistema sanitario ante agentes altamente patogénicos que nos vienen de fuera de nuestras fronteras, y que demuestra la poca atención que los países ricos han dedicado a la I+D en este tipo de enfermedades. No obstante, la reacción de los países mas desarrollados ha sido rápida y un esfuerzo considerable se está destinando a generar vacunas y agentes antivirales contra dicha enfermedad. También el año 2014 nos ha traído buenas noticias como los avances en I+D sobre antivirales frente al virus de la hepatitis C (HCV), una enfermedad que afecta entre 130-170 millones de personas a nivel mundial, en USA unos 2.7 M, y que en España se calcula que hay unos 900.000 personas afectadas, un 70% desconoce que la padece. Las ultimas recomendaciones del Gobierno sobre el uso de los nuevos medicamentos en los pacientes infectados por HCV y el nombramiento de un Comité de expertos sobre las pautas clínicas a seguir, son pasos importantes sobre el compromiso sanitario de nuestro país con la sociedad.

A lo largo del año 2014 hemos llevado a cabo muchas actividades de las que el Sr Secretario, Excmo. Sr D. Bartolomé Ribas, hará su presentación. No obstante quisiera resaltar las tomas de posesión de Académico de Honor, Excmo. Sr D. José Baselga del Memorial Sloan Kettering Cancer Center de New York, Académico de Numero, Excmo. Sr D. Jesús Pintor, cinco Académicos Correspondientes, la celebración de mesas redondas sobre temas de máxima actualidad, desde células madre, nuevos medicamentos, a la seguridad del paciente. Mención especial a la reunión entre congresistas con los profesionales del medicamento para debatir el tema de los fármacos biosimilares, por la transcendencia que estos medicamentos tienen en la sanidad pública y sus efectos económicos. También resaltar el curso avanzado sobre Obesidad en la RANF como exponente de la transmisión de conocimiento a alumnos de Farmacia en los temas mas actuales y relevantes sobre dicha patología. Conjuntamente con el sector farmacéutico y asociaciones profesionales se han llevado a cabo en los salones de la RANF, cursos, reuniones, conferencias, presentaciones de libros, con buena asistencia de público. En el contexto de publicaciones, se han publicado 3 volúmenes de los Anales, y el anuario (2014), agradeciendo al comité editor su esfuerzo para mantener la regularidad y calidad de las publicaciones.

Como continuación del encuentro entre las tres Reales Academias en ciencias de la vida, Farmacia, Medicina y Ciencias, se llevó a cabo la segunda reunión de la triaca en la RANF, como acto homenaje a uno de nuestros mas insignes Académicos y con mayor impacto en la microbiología española, la figura del Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. En una sesión memorable, en la que participaron Académicos de las tres Reales Academias, con presentaciones singulares y excelentes, se hizo entrega a D. Julio del libro

homenaje en su nombre que recoge las experiencias y testimonios de todos aquellos que compartieron directa o indirectamente momentos de la actividad científica de D. Julio. También tuvimos en el Instituto de España el acto homenaje a la antigüedad académica en la figura del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza en el que se hizo un repaso magistral a su brillante, larga y amplia actividad científica, académica y política.

Como parte del esfuerzo de la RANF por ampliar las relaciones con distintos sectores de las ciencias farmacéuticas y afines, se firmaron acuerdos marco con el grupo Cofares, la Fundación Dental Española y convenios puntuales con UCB-PHARMA, Zeltia-Pharmamar, Roche, Pfizer y Novartis. Quisiera también destacar la segunda reunión de ideas “brain-storm” entre los Académicos como foro de discusión donde emanaron sabias propuestas de cara al presente y futuro de la Academia.

Así pues, podemos plantar cara al nuevo año con los deberes bien hechos, a pesar de los fuertes recortes presupuestarios en todas las academias, pero que han sido en parte suplantados gracias a la generosidad, esfuerzo y buena disposición de los Académicos y personal que participa en nuestras actividades. También gracias al apoyo de la Fundación José Casares Gil hemos podido realizar y complementar dichas actividades.

Pero, ¿qué esperamos del 2015? Sin lugar a dudas y con la máxima que me caracteriza, “siempre adelante”, continuaremos desarrollando un número creciente de actividades científicas y académicas sobre enfermedades, medicamentos, aplicaciones, y el paciente, como temas centrales, y como ejemplo las conferencias ya programadas sobre virus emergentes (SARS, MERS, Ebola y chikungunya). Los avances sobre el desarrollo de nuevos fármacos con actividad dirigida hacia moléculas concretas, nuevas tecnologías, y otros temas de interés, serán presentados y debatidos en un ambiente coloquial, crítico y constructivo. Con la reciente creación de la Cátedra Juan Abelló, se debatirán los aspectos relacionados con los opiáceos y tratamiento del dolor por el propio Académico e invitados. Junto a la programación de conferencias y mesas redondas, celebraremos tertulias, presentaciones de libros, encuentros con la industria farmacéutica, cursos organizados por Cofares y la RANF, continuar con los encuentros entre las Comisiones de Sanidad del Congreso y Senado sobre fármacos, participación en la reunión de las sociedades iberoamericanas de farmacia en Barcelona. También seguiremos con la búsqueda de otros ingresos para ayudar en la organización de las actividades científicas, con subvenciones y donaciones de empresas, particulares, y alquileres de salas. Es fundamental conseguir los apoyos económicos que nos permitan realizar todas las actividades deseadas por la Academia, siguiendo la recomendación de su Majestad de fomentar mayor apertura de las academias a la sociedad. En este contexto, hemos aprobado la figura de Farmacéutico Colaborador RANF con el objetivo fundamental de proporcionar información científica a los farmacéuticos comunitarios sobre las aportaciones y avances de la ciencia en el sector farmacéutico y ciencias afines, incrementando el impacto formativo y de actualización científica sobre el medicamento en beneficio del paciente. El fin es establecer una dinámica y permanente conexión entre el farmacéutico comunitario y la RANF. La incorporación de nuevos Académicos es esencial para aportar sabiduría nueva, por lo que convocaremos plazas de Académico de Número, contando también con tomas de posesión de varios Académicos Correspondientes y uno de Honor (el Profesor D. Juan José Badimón del Mount Sinai Hospital de New York).

Desde el contexto de visibilidad de la Academia hacia el exterior, además de la página Web ranf.com contamos con una Biblioteca con el material digitalizado y un Museo que son utilizados y visitados por un amplio grupo de personas. El registro y divulgación en directo de las conferencias impartidas en la RANF por el canal audio de televisión RANF-TV que es visitado por muchas personas en España y en países Iberoamericanos, permite un mayor grado de conocimiento de nuestro buen hacer a la vez que da formación continuada a los profesionales farmacéuticos. Las conferencias en vídeo acumuladas a lo largo de los años servirán de base para establecer una sección en la Biblioteca y página Web donde queden inventariadas todas las conferencias en vídeo, que puedan ser utilizadas como consulta y formación en Facultades, centros de investigación, colegios y por profesionales del sector.

Siendo nuestra misión el fomento a la investigación y asesoramiento al Gobierno e instituciones públicas y privadas en el ámbito de las ciencias farmacéuticas y del Medicamento, estimularemos a que las distintas Secciones de la RANF se involucren en la elaboración de informes y divulgación de los mismos en los medios de difusión, prensa y radio, así como en la página Web de la RANF. La opinión de los Académicos de la RANF y elaboración de informes es importante de cara a su proyección en la sociedad, donde mucha de la información que se publica no refleja fielmente la noticia, como puede ser el tratamiento que se da a los fármacos genéricos, biosimilares, etc. Aunque la relación RANF-sector farmacéutico es excelente, debemos de incrementar el número de académicos y de actos con representación del sector. La concesión del máximo galardón de la Real Academia Nacional de Farmacia, la Medalla Carracido de oro al Dr. D. Juan Uriach, representa esa unión entre los Académicos y la industria farmacéutica.

Estamos viviendo una transformación de la ciencia, donde las nuevas tecnologías están abriendo nuevos horizontes en el conocimiento de los seres vivos con abundancia de datos moleculares, “big data”, que sería imposible de procesar por el ser humano. Gracias a los avances en métodos bioinformáticos, matemáticas, física, química y biología podemos acometer objetivos impensables hace unos pocos años. Vemos con satisfacción cómo las especialidades se solapan unas con las otras. El conocer los genes, cómo se activan y actúan en un momento determinado, bien en tumores, durante la metástasis, como resultado de una lesión cardíaca o cerebral, en procesos neurodegenerativos, alteraciones inmunológicas, procesos infectivos, durante la diferenciación celular y formación de órganos, la senescencia, etc., nos está llevando al diseño de nuevos fármacos con mayor especificidad. Los casos de fármacos antivirales frente al VIH y recientemente frente a hepatitis C son ejemplos paradigmáticos de diseño molecular con gran especificidad. La RANF debe ser foro de discusión de todos estos avances científicos y servir de puente de comunicación entre los profesionales del sector farmacéutico y la sociedad.

Finalmente, quiero terminar agradeciendo a la Junta de Gobierno, Junta General, Secciones y Comisiones el trabajo realizado que mantiene el nivel de excelencia exigido en la RANF. También mi agradecimiento al equipo Directivo por su incansable participación en las actividades del día-a día de la Academia, así como a todos los Académicos por su constante apoyo y colaboración. También mi agradecimiento al personal técnico de la Academia por su compromiso y ayuda. Mucho nos queda por hacer, y como dice el refrán “obras son amores y no buenas razones”.

Con mis mejores deseos a todos para el nuevo año 2015, he dicho.

MEMORIA DE SECRETARÍA. CURSO 2014

Memoria Anual de Secretaría



Año 2014

Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia



Excmo. Sr. Presidente de la Real Acad. Nal. de Farmacia;
Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales; Excmas. Sras. y Sres. Académicos, Presidentes
y delegados de las Academias de Farmacia de Cataluña, Galicia,
Reino de Aragón, Ibero-Americana, Santa María de España,
Castilla-León, Sras. y Sres.

La Real Academia Nacional de Farmacia, inició oficialmente las actividades del Curso Académico 2014, con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural el día 16 de enero, contando con la presencia de Excmo. Sr. Presidente del Instituto de España y de la Real Academia de Ciencias, Exac. Fís. y Naturales; Excmos. Sres. Vicepresidente y Secretario de la Real Acad. Nal. de Medicina y del Ilmo. Sr. Secretario General de Universidades del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Tras unas palabras de salutación del Presidente, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, el Académico Secretario que les habla, procedió a la lectura de la Memoria de Secretaria del año 2013

publicada en los Anales de la Academia.

A continuación, el Excmo. Sr. Don Antonio R. Martínez Fernández, efectuó la lectura del discurso reglamentario, titulado “Parasitismo. Origen e interés biológico”.

Se hizo entrega de una medalla de Académico Supernumerario; y de varias placas en reconocimiento a los servicios prestados, a varios Excmos. Sres. Académicos.

Y para finalizar la Sesión solemne, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2013.

“IN MEMORIAM!

Hemos de lamentar la pérdida por el fallecimiento del Académico de Número, Excmo. Sr. Don Perfecto García de Jalón y Huet; de la Académica de Honor Electa, Excma. Sra. Dña. Consuelo de la Torre García Quintana; y de los Académicos Extranjeros, Prof. Peep Veski, de Estonia; Prof. Ney Lobato Rodríguez, de Brasil y del Prof. Rafael Melik-Ohanjanyan, de Armenia; que nos había visitado recientemente, y que, juntamente con el prof. Tadashi Goino nos había donado una 2ª colección de grabados ukiyo-e de Japón.

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS

La intensa y relevante actividad científica, como es tradicional en nuestra Corporación, se ha llevado a cabo en Sesiones de jueves, intercalando en otros días de la semana, conferencias y tomas de posesión, para dar curso y fluidez a la actividad desarrollada por los miembros de nuestra corporación. Las conferencias y Mesas Redondas colgadas en la red, ha sido objetos de numerosas felicitaciones por académicos, tutores y profesores de másteres, por ser utilizadas éstas de nuestra página Web.

INCORPORACIÓN DE NUEVOS ACADÉMICOS

Como Académico de Número, tomó posesión el Excmo. Sr. Don Jesús Pintor Just, Medalla 36 de Ciencias Afines. Como Académicos de Honor fueron elegidos los Excmos. Sres. José Baselga que tomó posesión; y Juan José Badimón, que la tomará en fecha próxima.

Y como Académicos Correspondientes se produjeron 5 incorporaciones, 2 de ellas de nacionales, los Ilmos. Sres.: Don Miguel Ladero Álvarez y Don Gregorio Rodríguez Boto y 3 extranjeros, los Ilmos. Sres. Don Jean Martínez, de Francia, Don Paul Nguewa, de Camerún y Don Michael George Barbour, de EE.UU.



CONFERENCIAS

Se pronunciaron conferencias sobre diversos temas de actualidad, y por su cronología mencionamos al Dr. Adolfo Toledano Gasca, que trató el tema “Nuevas respuestas de la investigación de la enfermedad de Alzheimer: clínica, diagnóstico, patogenia y terapéutica”; el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just nos deleitó con la temática sobre “La melatonina para el tratamiento de las patologías oculares: ¡No la perdamos de vista!”; el Académico de Número y Vicepresidente, Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero nos ilustró con su conferencia “Un divertimento académico: Sabiduría popular y Genética”; la Dra. Purificación López García, Directora de investigación del CNRS de la Universidad París-Sur nos habló sobre el “Origen de los Eucariotas: Hechos y controversias”; el Académico de Honor Electo, Excmo. Sr. D. Juan José Badimón disertó sobre el tema “Lípidos y Enfermedad Cardiovascular. 2014 Update”; la Académica de Número, Excma. Sra. Dña. Carmen Avendaño López nos hizo reflexionar con su conferencia “Reflexiones sobre los avances y obstáculos en la lucha contra el cáncer”; el Dr. Pablo Amor, Director de la European

Research Council Executive Agency, nos actualizó sobre "El Consejo Europeo de Investigación, cuatro mil ideas para mejorar el futuro de todos", en la que también intervino la Dra. Cristina Gutierrez-Cortines, Eurodiputada y Catedrática de Historia del Arte que a modo de introducción, trató el tema "Una visión de la Investigación en Europa"; el Académico Extranjero, Prof. Christoph Friedrich nos habló sobre "Pharmacists in German Cultural History"; el Dr. Miguel Torres, Director del Departamento de Desarrollo y Reparación Cardiovascular del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas, trató el tema "Competición Celular en el Embrión y el Mantenimiento de los Tejidos"; Nuestro compañero, el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez, abordó el tema "Avances sobre el estudio geobotánico del Estado de California, EE. UU", que correspondió a una Sesión en Honor del Dr. Michael G. Barbour, que por enfermedad no pudo acudir a su toma de posesión, y en la que se leyó una laudatio a su persona; la Académica de Número, Excmo. Sra. Dña. Ana Mª Pascual-Leone Pascual, pronunció una conferencia titulada: "El concepto Darwiniano de la Allostasis. Epigénesis"; el Dr. D. José Ramón Luis-Yagüe, Director del Departamento de Relaciones con las CCAA de Farmaindustria, disertó sobre "Prescripción de medicamentos fuera de la ficha técnica (off-label)"; el también Académico de Número, Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, nos ilustró con su conferencia sobre "Los equipos interprofesionales y la terapia personalizada"; el Académico Correspondiente y de la Real Nal. de Medicina, Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada nos deleitó con la temática sobre "Visión actual del Universo"; y por último, el Académico de Número, Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, pronunció una conferencia sobre: "Cooperación hispano-francesa en actividades culturales y científicas a lo largo de la Historia".

REUNIONES Y ENCUENTROS

Cabe destacar, el "Segundo Encuentro entre Diputados y Senadores con Académicos de la RANF". En el que, los Laboratorios Merck ofrecieron una Jornada de trabajo sobre "**Biosimilares**" organizada por el Acad. Honorio Bando Casado. En la que se departió con los miembros de las Comisiones de Sanidad del Congreso y del Senado.



Otro acontecimiento relevante, fue, el que celebramos conjuntamente con las RR. AA. de Ciencias y de Medicina, con motivo de un acto homenaje al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva, titulado: "Microbiología y aplicaciones biotecnológicas". Esta reunión se inició con la "laudatio" a cargo del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza; además contó con la participación como ponentes los Excmos. Sres. D. Cesar Nombela Cano de Farmacia; Dña. María del Carmen Maroto Vela, de la de Medicina; y de D. Carlos

López-Otín, de la de Ciencias. Al homenajeado, se le entregó un libro con numerosas semblanzas sobre su vida científica, académica y humana, editado por el Excmo. Sr. Antonio R. Martínez Fernández.

FUNDACIÓN JOSÉ CASARES GIL.

La Fundación José Casares Gil ha contribuido con su patronazgo, al desarrollo de las actividades científicas, Mesas Redondas, curso, y difusión de la ciencia y la cultura apoyando numerosas Sesiones, de Enseñanza y futuro de la investigación en Farmacia.



Como la celebración del "1er Curso Avanzado sobre Obesidad", del que fue Directora la Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto, en colaboración con los coordinadores Excmos. Sres. Francisco José Sánchez Muniz, Antonio Luis Doadrio Villarejo y Bartolomé Ribas Ozonas. Contó con las intervenciones de eminentes científicos de España, EE.UU. y Chile, que atrajo numerosa audiencia de la juventud de cuatro Universidades españolas.

El curso tuvo un destacado éxito, por priorizar esta Real Academia tanto su difusión entre la juventud y la sociedad española, como la participación y atracción de la juventud universitaria, a nuestra Academia. Y que por sus numerosas

solicitudes recibidas, tuvieron que ser seleccionadas por el limitado aforo disponible. Por tal motivo, completo el cupo presencial, se amplió a la modalidad "on line" para profesionales.

MESAS REDONDAS

Describimos las Mesas Redondas y Tertulias Científicas celebradas por Secciones.

En la Primera, su Presidente, el Excmo. Sr. Don Antonio Monge Vega presentó a diversos conferenciantes cuyos nombres y temas han sido mencionados.

La Sección 2ª, que preside el Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández, organizó dos Tertulias Científicas con temas de gran actualidad, una coordinada por el Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero, nuestro Vicepresidente y Presidente de la Comisión de Bioética, con el título: "Aspectos bioéticos y jurídicos del aborto en la actualidad española", y otra coordinada por el Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández, cuyo ponente fue el Prof. Dr. Rafael Rotger Anglada, Director del Centro de Análisis Sanitarios de la UCM. Con el título: "EBOLA: breve recapitulación sobre etiología, epidemiología, patogenia, tratamiento y control.

Impulsada por la Sección 3ª, cuyo Presidente es el Excmo. Sr. D. Antonio Luis Doadrio Villarejo, y como cada año, el Excmo. Sr. Don Nicolás Víctor Jiménez Torres, coordinó el ciclo de conferencias anual, en colaboración con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, sobre: "Continuidad asistencial del paciente con quimioterapia oral". que fue presentada por nuestro Presidente, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, y el Dr. D. José Luis Poveda Andrés, Presidente de la Soc. Esp. de Farmacia Hospitalaria.

En la Sección 4ª, y coordinada por su Presidente, el Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez, se trató el tema "Situación actual de la Atención Farmacéutica Hospitalaria". Presentaron interesantes ponencias, las Doctoras Jefe de los Servicios de Farmacia Hospitalaria: Dña. Amalia Torralba, del Hospital Universitario Puerta de Hierro; Dña. Alicia Herrero, del Hospital Universitario La Paz, y Dña. Teresa Bermejo, del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Además, continuando bajo los auspicios de la Fundación, la Sección 4ª, celebró otra Mesa Redonda sobre: "Radicales libres en Farmacología y Terapéutica", coordinada por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno. Los ponentes fueron las Académicas Correspondientes, Dra. Mercedes Salaces Sánchez y la Dra. María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado.

La Sección 5ª organizó la Mesa Redonda sobre: "Células madre y aplicaciones clínicas", coordinada por su Presidente y también de esta Real Academia, el Excmo. Sr. Don Mariano Esteban Rodríguez, y que contó con las ponencias del Excmo. Sr. Pedro Guillén García, eminente Especialista en Traumatología y Ortopedia, Presidente y Fundador de la Clínica CEMTRO de Madrid, y del Dr. Manuel Serrano Marugán, Director del Programa de Oncología Molecular, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

También organizó la conferencia del Dr. Miguel Torres, Director del Departamento de Desarrollo y

Reparación Cardiovascular del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas, que trató el tema "Competición Celular en el Embrión y el Mantenimiento de los Tejidos".



La Sección 6ª que dirige la Excmo. Sra. Dña. Rosa María Basante Pol, celebró la Mesa Redonda aportando luz en una visión global y minuciosa sobre el tema "Medicamentos falsificados y seguridad del paciente", coordinada por ella misma. Contó con las ponencias de los Dres. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de nuestra y de otras numerosas Academias; Don Álvaro Domínguez-Gil Hurlé, Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia y la Dra. Belén Escribano Romero, Jefa del Departamento de Inspección y Control de Medicamentos de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

Y como todos los años, se celebró la Mesa Redonda conmemorativa de los Premios Nobel, coordinada por el Excmo. Sr. Don Juan Ramón Lacadena Calero.

Y finalmente, mencionar, las dos Mesas Redondas donde los miembros de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales, que Preside la Excmo. Sra. Dña. María del Carmen Francés Causapé, expusieron sus trabajos sobre el Balneario de Villa de Olmedo (Valladolid).

SESIONES NECROLÓGICAS.

Tuvieron lugar tres Sesiones Necrológicas.

La primera en memoria del Académico Numerario, en la Medalla 36, Excmo. Sr. D. Gaspar González González, en la que intervinieron los Excmos. Sres. Académicos de Número, D. Albino García Sacristán, D. Bartolomé Ribas Ozonas y D. Bernabé Sanz Pérez que disertaron sobre tres diferentes facetas del Prof. González, como Profesor, como Académico y como Amigo, respectivamente.

La segunda en memoria del Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro, Académico Correspondiente y Secretario de la Fundación José Casares Gil. Dicho acto se desarrolló en colaboración con la Real Academia de Doctores de España, a la cual pertenecía como Académico de Número. En ella actuaron como ponentes los Académicos de Número, Excmos. Sres. Dña. María Cascales Angosto, Don Julio Rodríguez Villanueva y Dña. Rosa María Basante Pol; y los Presidentes de ambas Reales Academias de Farmacia y de Doctores de España, ofreciendo un emotivo resumen biográfico sobre su persona.

La tercera Sesión necrológica, se celebró, en memoria del Excmo. Sr. Don Miguel Rubio Huertos, Académico de Número, Medalla 31, con las intervenciones de los Excmos. Sres. Académicos de Número, Don Julio Rodríguez Villanueva, Don Bartolomé Ribas Ozonas, y Don César Nombela Cano, que disertaron

respectivamente sobre: Su calidad científica y humana; como Académico; y sobre su vida investigadora y docente.

REUNIONES ACADÉMICAS INTERNAS

La Actividad Académica se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las Secciones se reunieron en 18 ocasiones y las Comisiones en 10. Además la Junta de Gobierno tuvo 10 sesiones, y la Junta General se reunió 3 veces de manera Ordinaria y 4 en Sesión Extraordinaria.

Durante el año 2014, se celebraron elecciones en los cargos de Tesorero y Secretario, siendo reelegidos ambos ocupantes para el segundo y último mandato, para el primero el Excmo. Sr. Don Fidel Ortega Ortiz Apodaca, y para el segundo el Excmo. Sr. Don Bartolomé Ribas Ozonas. Y Elecciones de medallas Carracido, en su categoría de Oro, para Don Juan Uriach Marsal por sus servicios a la FARMACIA; y de plata para los profesores Tadashi Goino de Japón y Rafael Melik-Ohanjanyan de Armenia, otorgadas en ocasión de su visita de cortesía y la donación de una segunda colección de grabados ukiyo-e de Japón de inicios del siglo XIX.

PREMIOS Y DISTINCIONES RECIBIDAS POR LOS ACADÉMICOS.

Es gratificante comentar en esta ocasión solemne, los puestos de responsabilidad en algunas instituciones y organismos estatales otorgados a algunos compañeros Académicos, que ha llegado a nuestro conocimiento y que citamos a continuación.

Nuestra Académica de Número la Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, tomó posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña.

La Excmo. Sra. Dña. María Vallet Regí, recibió el Premio de Investigación Miguel Catalán de la Comunidad de Madrid, en reconocimiento a su trayectoria profesional, docente e investigadora.

A la Excmo. Sra. Dña. Rosa M^a. Basante Pol, le ha sido entregada la Cruz de Honor de la Sanidad de Madrid, en su categoría de Oro, otorgada por la Comunidad de Madrid.

Los Excmos. Sres. Don Benito del Castillo García y Don Fidel Ortega Ortiz Apodaca fueron designados, a propuesta del Consejo Rector del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, miembros del Comité de la Farmacopea y del Formulario Nacional, del que tomaron posesión. Asimismo, el Prof. Benito del Castillo García ingresó como Académico Correspondiente en la Academia de Farmacia "Reino de Aragón".

El pasado diciembre se celebró en la Sede del Instituto de España, la Sesión de Homenaje a la Antigüedad Académica en honor del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, cuya "*laudatio*" corrió a cargo de la Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto en presencia de los Presidentes de las ocho Reales Academias y numerosos Académicos, familiares e invitados.

La Residencia de Estudiantes rindió homenaje a nuestro Académico de Honor, Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini con la celebración de la Mesa Redonda "Entre el humanista y el Científico".

DISTINCIONES A NUESTROS ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

Nuestra Académica Correspondiente y Presidenta del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, la Ilma. Sra. Dña. Carmen Peña López fue elegida Presidenta de la Federación Internacional Farmacéutica (FIP), en el Congreso Internacional habido el pasado mes de agosto en Bangkok.

En Acto presidido por el Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas se concedió la Medalla de Honor al Fomento de la Invención, de la Fundación García Cabrerizo, a dos Académicos, los Excmos. Sres. D. José María Ventura Ferrero, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y a Don Pedro Guillén García, Director de la Clínica CEMTRO de Madrid. Don Pedro Guillen García, además de conferenciante en nuestra Academia sobre células madre ya citada, y por toda una vida de excelencia, innovación, y prestigio científico de rigor y calidad, en las facetas experimental quirúrgica, el Presidente de la Comunidad de Madrid, Ignacio González le impuso la Medalla de Oro de la Comunidad de Madrid; y tomó posesión de Académico de Honor de la Real Academia de Medicina de Murcia; y celebró su 13 Simposio Internacional de Avances en Traumatología y Ortopedia, con eminentes científicos mundiales.

El Académico, y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina, el Excmo. Sr. Francisco González de Posada, ha sido nombrado Académico de Honor de la Real Academia de Cultura de Valencia.

El Académico D. Antonio González Bueno, Académico Correspondiente, y Catedrático de la Facultad de Farmacia de la UCM, tomó posesión como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Castilla y León.

El Académico Secretario de la Fundación Casares Gil, Don Honorio Bando Casado, tomó posesión como Acad. Correspondiente de la Real Academia de Jurisprudencia y Legislación; y nombrado correspondiente de la Real de Doctores de España.

La Académica Dña. Josefina Sanmartín Bacaicoa, ha sido nombrada Presidente de Honor de la Sociedad Española de Hidrología Médica en el pasado mes de noviembre.

Los Académicos Extranjeros, Profesores Dr. Don. Rubén Hilario Manzo de Argentina; y Dr. Don. Andrés Amarilla de Paraguay, fueron elegidos respectivamente, Presidente de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia, y Vice-Rector de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

A nuestra Académica Correspondiente electa, la Ilma. Sra. Dña. Ascensión Marcos Sánchez, se le otorgó el Premio del Instituto Danone 2014, por su relevante trayectoria Científica.

Felicitamos a todos nuestros eminentes Académicos, por su elevado nivel y prestigio en los ambientes científicos de nuestro país e internacionales, por su esfuerzo, dedicación y entrega, que realza el de esta Academia y de España, así como el desarrollo de la ciencia en beneficio de la humanidad.

CONVENIOS DE COLABORACIÓN Y ACTOS EXTRAORDINARIOS

Se han firmado nuevos Convenios de colaboración: con la Fundación Dental Española, y con el Grupo COFARES, por los que en nuestra sede tuvieron lugar conferencias sobre: “Patologías prevalentes” en “Artrosis”, “Artritis-Gota” y “Osteoporosis”. Convenios puntuales con Pharmamar Zeltia, con quien celebramos la jornada sobre “La búsqueda de fármacos innovadores: nuevos mecanismos de acción”. Con Novartis, con Merck, Sharp & Dohme; y UCB Farma, con la Presentación del Libro: "Gestión Hospitalaria y acuerdos de riesgo compartido en España".



En colaboración con el Excmo. Ayuntamiento de Cádiz, y promovido por nuestro Académico correspondiente, y numerario de la Real de Medicina Excmo. Sr. Don Francisco González de Posada, esta Academia forma parte del tribunal que selecciona los trabajos presentados al Premio anual “José Celestino Mutis de Botánica Cortes de Cádiz”, que en su edición 2014, le fue otorgado al Real Jardín Botánico de Madrid, por la custodia, promoción y difusión del legado de Celestino Mutis", recogido por su Director el Prof. Dr. Gonzalo Nieto Feliner y equipo de trabajo de dicha institución.

En nuestra sede tuvieron lugar distintos actos y reuniones extraordinarias, como la reunión de trabajo entre

la Real Academia Nacional de Farmacia y la Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia.

Nuestra sede también albergó el Acto de presentación del libro, "Investigación Traslacional: Aprendiendo a Escuchar", que fue presentado por el Presidente, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban y fue clausurado por la Secretaria de Estado de I+D+i, Ilma. Sra. Dña. Carmen Vela Olmo.

También en nuestra sede Académica los Laboratorios SERVIER presentaron el medicamento Daflón 500.

Con motivo de la celebración de los 400 años de relaciones hispano japonesas, la Real Academia Nacional de Farmacia junto con la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, la Embajada de Japón, Fujitsu y Caja Murcia, organizaron la exposición "Fantasia en Escena", en la sede de la de Bellas Artes. Dicha exposición mostró 114 grabados en 84 cuadros. de arte Ukiyo-e de la primera mitad del siglo XIX y de la Escuela Utagawa, de la colección de esta Real Academia; y dos conciertos, de inauguración y de clausura.



Añadimos el acto del pasado mes de mayo, de entrega de la ya mencionada nueva colección de grabados Ukiyo-e, de la primeros años del siglo XIX.

También tuvieron lugar dos reuniones de Asociación Española de Derecho Farmacéutico, con motivo de la publicación del Real Decreto de Precios recientemente publicado, a las que acudió el Director del Departamento de Precios del Ministerio de Sanidad.

Se realizó un Acto de la Fundación Ciencias de la Salud, con el título: "Las causas de la guerra de sucesión o el valor de una Historia Crítica"; organizada por el Académico Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento.

Y el Acto de entrega de premios de la Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes, presidido por nuestro Presidente y el Presidente de dicha Asociación Ilmo. Sr. José Félix Olalla.

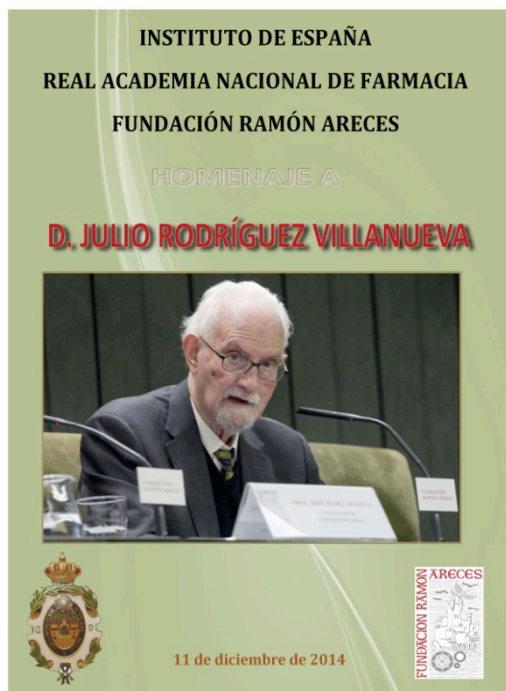
Difusión de la Ciencia y del Conocimiento, es uno de los objetivos primordiales de las Reales Academias, y destacamos que en el Curso 2014, la nuestra, ha continuado con la gran difusión en las Revistas del Sector Farmacéutico, de los programas de actividades y de sus resúmenes. Además, de la actualización de los portales Web, con el incremento y renovado de contenidos, consiguiendo relanzar la difusión de la ciencia a nivel nacional e internacional, en beneficio de la formación de la sociedad actual y de la humanidad. Quiero destacar este año que nuestro portal RANF TV, ha tenido una gran acogida de público y hemos recibido numerosos comentarios de felicitación por la disponibilidad de las conferencias de elevado nivel científico, para estudiantes universitarios.

En el portal publicaciones, se han editado "on line" los 4 números de "Anales" correspondientes al año 2014. Asimismo se ha publicado "on line" y en papel, el libro homenaje a Don Julio Rodríguez Villanueva, coordinado y editado por el Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández.

Y como todos los años, se ha publicado en papel, el Discurso de la Sesión Inaugural ya mencionado, y el "Anuario" nº 66 de nuestra institución.

Todas estas mencionadas obras, han sido coordinadas por nuestro Acad. Excmo. Sr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, y se publicaron en un lujoso formato de libro electrónico o "e-book" en edición "on line" y digital

DVD para PC Windows y Mac.



En cuanto a la Biblioteca y el Archivo, el año 2014 ha sido prolífico.

Se ha continuado con el proceso de digitalización del fondo antiguo o histórico, gracias a la ayuda concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Se han completado las revistas farmacéuticas del siglo XIX. Digitalizado una veintena de revistas, entre otras *El jurado médico-farmacéutico*, *Los nuevos remedios*, *El telégrafo médico*, *el Boletín Farmacéutico*, etc.

Se han obtenido 33.000 imágenes, que se pueden consultar en el Catálogo virtual (Biblioteca virtual de la Real Academia Nacional de Farmacia), todas ellas integradas en los repositorios digitales colectivos, Hispana y Europea. Y se ha solicitado una nueva ayuda para continuar con la digitalización de los libros del siglo XIX, una vez completadas las publicaciones periódicas.

Y una nueva labor de la Biblioteca es la recepción y maquetación de los artículos para los Anales, a través de la plataforma Open Journal System.

Asimismo se ha continuado con el proyecto de catalogación y digitalización, consiguiendo realizar alrededor de 1.200 fotografías de los siglos XIX y XX, que ahora se guardan en la nueva ubicación del archivo, disponibles en nuestra Biblioteca Virtual. Se ha elaborado una página independiente dentro de la Biblioteca virtual para darle un mayor realce y difusión a este proyecto.

Catalogación de 99 nuevos registros incluidos en el catálogo, de los cuales 33 corresponden a fotografías de las cajas de folletos (en proceso). De la colección de fotografías antiguas de la RANF (en proceso).

Se han recibido donaciones de libros de diversos Académicos y de Academias, que por necesidad en la brevedad no podemos enumerar. Así como el expurgo de publicaciones en excedencia. Más de 500 libros de la serie Monografías de esta Real Academia, se distribuyeron entre los asistentes de las 4 Universidades de Madrid, durante el “Curso avanzado sobre Obesidad” celebrado en el mes de abril. Además se ha atendido a Académicos y a usuarios externos y prestaciones de revistas y libros, a través de los distintos medios y correo electrónico.

El Museo de la Farmacia con la Sala Utagawa ha sido muy visitado por grupos e instituciones, como en años anteriores acompañados principalmente por el Jefe de Negociado, Don Manuel Tirado y en ocasiones por este Secretario.

Tenemos que agradecer a la Excm. Sra. Dña. M^a Ángeles Jiménez Díez de la Lastra, viuda del Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, la donación de un autoclave del siglo XIX, que se encuentra expuesto en nuestro Museo.



Por último queremos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, que gracias a la subvención presupuestaria recibida en el Curso 2014, hemos podido realizar las actividades científicas programadas, el mantenimiento de la página web, la digitalización de la Biblioteca y el mantenimiento de nuestro personal.

Agradecer a nuestro querido compañero, el Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, su inestimable ayuda y colaboración, así como para el concurso de premios, a todos sus patrocinadores,: CINFA, Consejo de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, y Colegio de Farmacéuticos de Madrid y Antonio Doadrio López, que posibilitan premiar la labor científica principalmente de jóvenes investigadores. Asimismo agradecemos a los Patronos, miembros y socios de la “Fundación José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, su importante contribución a las actividades académicas de difusión de la ciencia y formación de la juventud y de la sociedad española, y a los numerosos Colegios de Farmacéuticos de España que en atención a la brevedad de esta exposición y para no cansarles, no podemos enumerar.

Termino dando las gracias a todos los Académicos de Número y Correspondientes por la colaboración prestada, tanto a aquellos que han participado día a día a las actividades realizadas en nuestra sede, a los que han organizado e intervenido con interesantes conferencias, como a los que han permitido con su asistencia y contribución, colocar nuestra Academia en lo más alto del nivel científico y de mayor prestigio entre las instituciones españolas; y al personal contratado, que mantiene día a día el funcionamiento de la misma, y el exquisito trato a los Académicos.

Muchas gracias por su atención.



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el primer trimestre del año 2015, tuvieron lugar numerosas reuniones en nuestra sede académica, primordialmente 10 Sesiones científicas académicas, y múltiples reuniones de Secciones, tertulias científicas, actos de presentación de libros, y de otras instituciones como las Academias de Ciencias Odontológicas de España y la Real Academia de Doctores de España, de algunos organismos oficiales y profesionales, Cofares y de la Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes. (AEFLA).

La celebración de la Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2015, tuvo lugar el 22 de enero a las 19 horas. Al Acto acudieron numerosas personalidades de las instituciones del Estado, del mundo Académico y farmacéutico. En la mesa presidencial acompañando al Presidente de la RANF, Excmo. Sr. Mariano Esteban Rodríguez, tomaron asiento el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo Tixaire, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; el Excmo. Sr. D. Jesús Álvarez Fernández-Represa, Presidente de la Real Academia de Doctores de España; el Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero y el Secretario de la misma el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

Se inició la Sesión oficial con unas palabras de bienvenida del Presidente, quien relató las nuevas consecuciones y Convenios, jornadas de excelencia científica, y comentó un Resumen de las Actividades oficiales realizadas durante el curso académico finalizado de 2014. Cedió la palabra al Excmo. Sr. Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas quien pasó a dar lectura de la Memoria de Secretaria 2014, que una vez finalizada, dio la palabra al Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, quien pasó a dar lectura del discurso reglamentario, con el título: "Ciencia de doble uso: los farmacéuticos y los gases tóxicos durante la Guerra Civil Española (1936-1939)" que tuvo un gran impacto en la numerosa audiencia.

A continuación se hizo entrega de la Medalla Carracido en su categoría de Oro al Excmo. Sr. D. Juan Uriach Marsal, y para finalizar se procedió a la entrega de Premios del Concurso Científico 2014.

El 29 de enero la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Ilma. Sra. Dña. Ascensión Marcos Sánchez, Profesora de Investigación y Directora del Grupo de Inmunonutrición del CSIC, quien pronunció el discurso con el título "El estilo de vida como factor clave de la Inmunonutrición". Fue presentada por el Académico de Numero de la corporación el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz.

El 5 de febrero tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Farmacia la Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Dr. D. Godofredo Diéguez Castrillo, Catedrático de Fisiología de Universidad Autónoma de Madrid, quien nos deleitó con su conferencia titulada: "Isquemia-reperusión coronaria: función de la endotelina-1".

Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Albino García Sacristán, Académico de Número de la RANF. El recipiendario nos informó de forma amena que la restauración del flujo sanguíneo por la arteria coronaria obstruida (reperusión) es el tratamiento más eficaz para mejorar el pronóstico de los pacientes con infarto agudo de miocardio. Paradójicamente, este tratamiento "per se" puede producir lesiones en el miocardio afectado (lesiones por isquemia-reperusión (I-R), para las cuales no disponemos de tratamiento eficaz. En las investigaciones propias de su Departamento, la I-R produjo disfunción endotelial y aumento de la respuesta vasoconstrictora coronaria a la ET-1 así como aumento de la sensibilidad de sus receptores (ETA y ETB); estos efectos se relacionaban con la intensidad y la duración de la isquemia previa a la reperusión. El aumento de los efectos de la ET-1 podría deberse a la disfunción endotelial y al incremento de la sensibilidad/expresión de los receptores ETA y ETB en los vasos coronarios. Asimismo, los antagonistas específicos de ambos tipos de receptores mejoraron la función cardiaca y la supervivencia de los animales tras la I-R. Por tanto, la ET-1 podría estar implicada en el daño vascular coronario producido por la I-R, y el bloqueo selectivo de los receptores para este péptido podría atenuar las lesiones por reperusión.

El 12 de febrero tomó posesión como Académico Correspondiente el Ilmo. Dr. D. Eloy García Calvo, Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá de Henares, quien impartió la conferencia titulada: "Agua y salud pública: pasado, presente y futuro".

Se refirió el nuevo Académico, que fue presentado por el Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Académico de Número de la RANF, a que el agua es un elemento fundamental para la vida y así se percibe desde que la humanidad existe. Desde el principio el hombre tiene aversión al agua que no sea transparente e inodora. Se encuentran vestigios de infraestructuras hidráulicas de hace 5000 años en Mesopotamia. Prosiguió con un recorrido histórico resaltando hallazgos en Egipto, Pakistán y Creta. Con referencias a Hipócrates con tratados sobre calidad de agua, Roma, y recordando la construcción del "Great Conduit" de Londres para llevar el agua a sus calles.

El crecimiento de las ciudades genera importantes problemas medioambientales y de salud. Ya en el siglo XIX se demuestra, por primera vez en Londres, que el sistema de distribución de agua expandía el cólera, antes incluso de descubrir los gérmenes como transmisores de enfermedades. Entre los siglos XIX y XX, se llevan a cabo las primeras operaciones de potabilización a gran escala, la filtración y poco después la cloración. A principios del XX se comienzan a tratar las aguas residuales con microorganismos, los "lodos activados". De esta manera se completa el conocimiento para llevar a cabo el ciclo urbano del agua con garantía. Señala que, a pesar de todo el avance en conocimiento, son las enfermedades relacionadas con el agua las causas más importantes de mortalidad en nuestro planeta. Enfermedades como el cólera, diarrea común o malaria causan un número enorme de muertes y todas ellas están vinculadas directa o indirectamente al agua. Otro problema emergente es la resistencia de patógenos a antibióticos, fármacos antiparasitarios o insecticidas. A la contaminación química se le asigna una menor prioridad porque su efecto no es tan inmediato como la microbiológica.

El número de potenciales contaminantes químicos es enorme. Al arsénico y flúor, contaminantes de origen natural y muy comunes en diferentes zonas geográficas, hay que añadir los más de 30.000 compuestos que se producen en grandes cantidades en el mundo. Vinculados al agua, la UE ha elaborado una lista de 45 sustancias y grupos de sustancias que denomina prioritarias y que deben tener un especial control en las aguas de la UE. Entre las sustancias se encuentran desde metales pesados a desinfectantes, pasando incluso por fármacos. Cada vez es mayor el número de sustancias que usamos en nuestros hogares que, después de tratadas en las depuradoras, aparecen en el medio natural. Son los contaminantes emergentes.

Y finalmente se refirió a que se investigan los posibles efectos de la exposición por largos periodos, a los efectos combinados de esos contaminantes y los hipotéticos riesgos para determinados grupos como embarazadas o niños. El gran número de compuestos a identificar, las bajas concentraciones a medir y los efectos sinérgicos son los grandes retos actuales en la investigación de estos compuestos. A esas tareas se dedica el nuevo académico, y un gran número de grupos de investigación en todo el mundo.

El 19 de febrero nuestra sede albergó, con el Patrocinio de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, una nueva importante y atractiva conferencia sobre "Virus emergentes: Coronavirus y Virus Ébola" pronunciada por el Prof. Dr. Luis Enjuanes, Profesor de Investigación, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El 26 de febrero la Real Academia Nacional de Farmacia se honró en celebrar la Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Félix M. Goñi Urcelay, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco, quien disertó sobre "Las membranas como fronteras celulares: aduanas y contrabandistas". Fue presentado por la Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF.

El 5 de marzo se celebró una Mesa Redonda, patrocinada en colaboración por la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre el Balneario de Villavieja (Castellón), en la que intervinieron: la Excm. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé, el Dr. José López Guzmán y la Dra. María López González, que hablaron sobre "Historia y Generalidades"; el Dr. Antonio Mestre Barceló, disertó sobre el "Estudio de la Climatología"; los Dres. Juan Antonio López Geta y Antonio Ramírez Ortega, nos ilustraron sobre el "Estudio Hidrogeológico de las aguas del Balneario"; los Dres. Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata y Miguel Ladero Álvarez, hablaron del "Estudio sobre la Vegetación del Entorno de las Aguas del Balneario"; y las Dras. Carmen de las Heras Iñiguez y M^a Antonia Simón Arauzo nos informaron sobre el "Análisis de la Radiactividad en las aguas del Balneario".

El Balneario de Villavieja se encuentra en pleno centro de esa localidad, en la Plaza de la Villa nº 5, en un edificio del siglo XIX. Es un Balneario de gran tradición histórica, situado en la provincia de Castellón y en la Comunidad Autónoma de Valencia. Se encuentra al pie de la Sierra del Espadán, en la Comarca de la Plana Baja. Se hace mención de la importancia cultural y terapéutica que ha supuesto para la localidad el termalismo gracias a las aguas minero-medicinales que abundan en la misma. Se estudia el entorno, destacando las particularidades del Parque Natural de Sierra Espadán, y asimismo las noticias históricas sobre la utilización de las aguas minero-medicinales del Balneario que ya eran conocidas por los romanos y que gozaron de gran nombradía en los siglos XVIII, XIX y XX en el Reino de Valencia y que atraían a muchos bañistas, fueran pacientes o no, de Valencia, Castellón y Teruel principalmente. Se hace mención a sus propietarios a través del tiempo hasta la actualidad, a los diferentes análisis químicos realizados desde el siglo XVIII que determinaban la composición química de sus aguas, así como a los médicos Directores del Balneario que eran responsables de aplicar las

distintas técnicas hidroterápicas a los pacientes para la cura de sus enfermedades. También se hace mención del número de pacientes que frecuentaron el Balneario así como hacemos referencia a la acción terapéutica atribuida a las aguas del mismo. La cuidada y esmerada atención no sólo sanitaria prestada en el Balneario sino también en su Hotel hacen de este establecimiento un auténtico Centro de Salud que hace posible la recuperación de los pacientes y el deseo de volver a disfrutar nuevamente de unos días de relax en él.

El 12 de marzo se celebró en la Real Academia Nacional de Farmacia la Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Ilma. Sra. Dña. Esperanza Torija Isasa, Catedrática de Nutrición y Bromatología en la Facultad de Farmacia de la UCM, quien pronunció su discurso titulado: "El colorido de los alimentos de América". Fue presentada por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez.

Nos deleitó comentando con extraordinaria amenidad, que la naturaleza está llena de color y de ofertas para la subsistencia de los seres vivos, en general, y del ser humano en particular. Y el color es uno de los atributos de los alimentos que nos hacen seleccionarlos para su consumo; los compuestos responsables de dicho color, los pigmentos, son motivo de numerosos estudios que avalan sus propiedades beneficiosas para la salud. Nuestra alimentación está orientada a consumir los productos alimenticios incluidos en la denominada Dieta Mediterránea, diferente a la que fue en su principio, y en la que actualmente están incluidos muchos de los alimentos traídos del continente americano. Precisamente en ellos vamos a centrar nuestra atención. Del Nuevo Mundo llegaron a nosotros, frutas, hortalizas, tubérculos, cereales... de los más variados colores que se deben a carotenoides, antocianos, betalainas..., de importante carácter antioxidante, que reportan beneficios innegables a quienes los consumen. Si pensamos en la trílogía alimentaria mediterránea, trigo – olivo – vid, esto es pan – aceite – vino, o en la trílogía de Mesoamérica, maíz – frijol – calabaza, que incluyen productos básicos de ambas zonas del mundo, podríamos añadir ahora una nueva, que, en conjunto, tiene en cuenta los alimentos de mayor interés para nosotros; sería: alimentos vegetales – color – salud, como resumen de una alimentación saludable.

El miércoles 25 de marzo, se celebró en la Sede de la RANF, una Mesa Redonda en la que colaboraron la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación Lilly. El tema: Debate y Actualización sobre "Ética y transparencia en la investigación biomédica".

Este importante acto fue presidido por el Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez y el Presidente de la Fundación Lilly, Ilmo. Sr. D. Javier Ellena Aramburu, quienes inauguraron y presentaron la sesión, y fue moderada por el Ilmo. Sr. Honorio Carlos Bando Casado, Secretario de la Fundación José Casares Gil de la RANF; y por el Director de la Fundación Lilly, Dr. José Antonio Sacristán del Castillo.

Las ponencias corrieron a cargo de los Prof. Dr. Javier Arias Díaz, Subdirector General del Instituto de Salud Carlos III: "Marco ético en la investigación científica". Dr. Rafael Dal-Ré Saavedra, Programa BUC (Biociencias UAM+CSIC), Campus de Excelencia Internacional, Universidad Autónoma de Madrid: "Comunicación y difusión de los resultados de los ensayos clínicos"; y D. Oscar Prieto Martínez, Presidente de la Asociación de Afectados por Tumores Cerebrales en España (ASATE): "Acceso a la información sobre ensayos clínicos. La perspectiva de los pacientes. Retos y oportunidades".

El 26 de marzo se celebró la Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Wolfredo Wildpret de la Torre, Catedrático Emérito de Botánica Universidad de la Laguna quien pronunció su discurso titulado: "Mitos y realidad de los Dragos". Fue presentado por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez.

Se refirió a que quizás no sea aventurado considerar al drago (*Dracaena draco*) como el vegetal más emblemático de Canarias ya que, a pesar de no ser exclusivo de ellas, su portentosa e inconfundible estampa ha sido relacionada desde tiempos remotos con las Islas Afortunadas. El Drago por su sobrecogedor aspecto, que algunos han comparado con un animal fabuloso, ha llamado siempre la atención de propios y extraños. Así, ha sucedido desde la antigüedad siendo considerables las referencias que pueden encontrarse en algunos autores grecolatinos. En el barroco español, fueron muchas las obras literarias en las que se hace alusión al drago y su "sangre". En el Archipiélago Canario, los dragos silvestres viven en barrancos, laderas y riscos de las zonas bajas y medianías, en una posición intermedia entre la vegetación árido-semiárida de los tabaibales y cardonales, y la vegetación seco-subhúmeda del Monte Verde, dentro de la potencialidad del bosque termófilo de sabinas y acebuches *Junipero canariensis* - *Oleatum cerasiformis*.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar: El Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, ha sido nombrado "Hijo predilecto" de Carriches, Toledo.

El Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Sr. D. Antonio Luis Doadrio Villarejo ha sido elegido Académico de Número de la Real Academia de Doctores de España.

El pasado día 25 de febrero, nuestro compañero Académico Excmo. Sr. D. Benito del Castillo, recibió un doble homenaje en la ciudad de Mérida, Venezuela, por parte del Concejo Municipal nominándole huésped distinguido de dicha ciudad estudiantil. Asimismo, recibió un diploma como Colegiado de Honor del Colegio de Farmacéuticos del Estado de Mérida, tras participar en varias conferencias y un tribunal de Tesis en la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes, de la que es Doctor Honoris Causa.

Dña Carmen Peña López recibió el premio de la Real Academia de Farmacia de Cataluña en su reciente solemne Sesión de apertura de curso, y Académica de Honor de la Academia de Farmacia de Castilla-León y recientemente es nombrada

Farmacéutica del año.

El Dr. Pedro Guillen García, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, ha sido elegido "FIFA Medical Centre of Excellence". Dos Ministras del Gobierno España y el delgado de la FIFA, le entregaron el Diploma de excelencia, lo que honra los ambientes científicos y sanitarios de nuestro país.

El Dr. Alfredo Martínez Hernández, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, ha sido elegido Académico Correspondiente Electo de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, y tomará posesión en el mes de mayo.

Además la Academia ha albergado y participado en sesiones y actos extraordinarios relevantes para el mundo de la ciencia y la investigación.

El 11 de febrero, en los locales de la Casa de Iberoamérica de Cádiz, se reunió el tribunal encargado de la concesión de la VII edición del Premio Iberoamericano de Botánica José Celestino Mutis, Cortes de Cádiz. Con la asistencia como representantes de la RANF del Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez, Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario y el Ilmo. Sr. D. Francisco González de Posada, creador de dicho premio y Académico Correspondiente RANF y de Número de la RANM. Tras la correspondiente deliberación se acordó por unanimidad, atendiendo a la extraordinaria calidad e innovación científico-botánica a nivel internacional del trabajo, conceder el VII Premio Iberoamericano de Botánica "José Celestino Mutis" Cortes de Cádiz, a Don Gonzalo Navarro Sánchez.

El 24 de febrero dio comienzo la primera de las conferencias que el Instituto de Formación Cofares y la RANF van a impartir dentro del ciclo sobre "Intervención Farmacéutica en Patologías Prevalentes". En este caso trato sobre "Conjuntivitis y Rinoconjuntivitis".

El 24 de marzo tuvo lugar la segunda conferencia de COFARES y la RANF, dentro del ciclo nombrado anteriormente, que trató sobre "Asma y EPOC".

En el marco del convenio firmado entre la RANF y la Fundación Dental Española han tenido lugar en este trimestre los siguientes actos:

El 26 de enero se celebró la Toma de Posesión como Académico de Número en la Medalla Nº1, del Excmo. Sr. D. Antonio Bascones Martínez, quien pronunció su discurso titulado "Medicina periodontal: una interrelación entre la cavidad bucal y el organismo general".

El 16 de febrero tuvo lugar la Toma de Posesión en la Medalla Nº2 del Excmo. Sr. D. Manuel Bravo Pérez, quien habló sobre "Calidad de Vida Oral".

El 16 de marzo se celebró la Toma de Posesión de la Medalla Nº3 del Excmo. Sr. D. Juan José Segura Egea, que pronunció su discurso "Respuesta inmune innata de la pulpa dental frente a la caries: el papel del odontoblasto".

Y finalmente del 25 al 27 de marzo 2015, tuvo lugar en Barcelona el "VI Encuentro de Academias de Farmacia Iberoamericanas", al que asistió como delegado el Académico secretario Excmo. Sr. Bartolomé Ribas Ozonas y participaron como ponentes los Académicos Antonio Monge Vega; Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y D. Rafael Sentandreu Ramón.

Como objetivos se propusieron: la divulgación del conocimiento científico a la población en general y el asesoramiento de las autoridades sanitarias y profesionales afines.

Educación y formación de la Sociedad, con preferencia de la juventud, futuro de la misma. Para ello consideramos esencial el contacto con los Institutos y Colegios de Enseñanza.

Posicionamiento, opinión profesional e independiente de las Academias en el asesoramiento a las autoridades sanitarias, farmacéuticos y profesionales afines y sociedad en general, para el bienestar y calidad de vida de la humanidad.

Se consideran todos ellos dentro del contexto de lo aconsejado por Su Majestad el Rey Felipe VI, con la difusión indispensable a los medios de comunicación y aplicación de las Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones, para el conocimiento de las Academias por la Sociedad en general y en beneficio de la Humanidad.

Se consideraron temas de difusión por las Academias a la Sociedad: Origen, desarrollo del medicamento / Registro y control / Vacunas / fármacos / productos innovadores / genéricos / productos biológicos / biosimilares / plantas medicinales / farmacovigilancia y asesoramiento al Ministerio de la Salud / seguimiento del medicamento / qué es el medicamento y objetivo de eficacia, dosis-peso / dosis-efecto / seguridad y eficacia frente a internet y ante la patología/ confianza en los efectos ante el engaño y adulteración / eficacia medicamentosa y curación de la enfermedad / evidencia del efecto farmacológico en interés del paciente.

Y finalmente se tomaron decisiones: se desarrollará y publicará un "Documento de Barcelona 2015", después del consenso y supervisión por las Academias participantes. Que la Reunión sea bienal. La próxima Reunión, el "VII Encuentro de Academias de Farmacia Iberoamericanas" tenga lugar en Asunción, Paraguay. Organizada por la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Paraguay. Y que se considera definitivamente "Invitada permanente" la Academia Nacional de Farmacia de Francia, y que estuvo presente, como delegado de la misma, el Académico Claude Monneret, actual Vicepresidente, y próximo Presidente.



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA