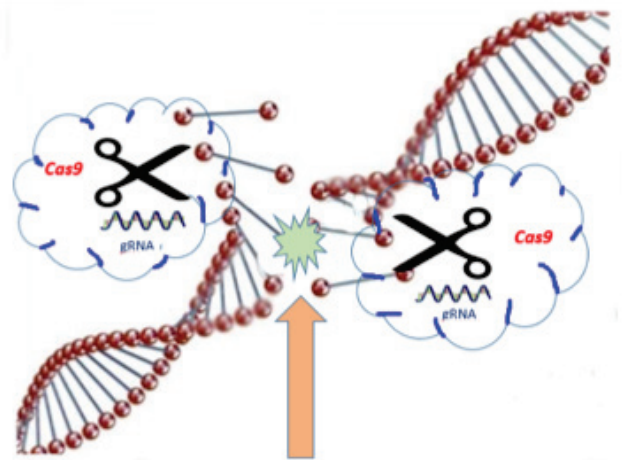


Encuentros en la Biología



ALEXANDER VON HUMBOLDT
(1769-1859)



Secuencia complementaria al gRNA que sufre la acción de las enzimas Cas9

CRISPR/Cas9: La enésima
revolución metodológica

Agricultura

Fertilizantes nitrogenados

Fisiología

Osmorregulación en peces teleósteos

Equipo Editorial y Créditos

Co-Editores:

José María Pérez Pomares

jmperezp@uma.es

Biología del desarrollo y cardiovascular
Coordinación general- Editoriales- Entrevistas
Miguel Ángel Medina Torres
medina@uma.es
Biología Molecular y de Sistemas-Biofísica-
Bioquímica
Coordinación general- Editoriales- Monitor-
Maquetación

Comité editorial ejecutivo:

Ana Grande

agrande@uma.es

Genética-Virología, Patogénesis virales
Rincón del doctorando

Antonio Diéguez

dieguez@uma.es

Filosofía de la Ciencia
A Debate-Recensiones

Carmen González

carmen.glez@uma.es

Información y Documentación
Calidad y difusión

Enrique Moreno Ostos

quique@uma.es

Ecología- Limnología
Punto de Encuentro

Enrique Viguera

eviguera@uma.es

Genética- Genómica
Monográficos-Eventos especiales

Héctor Valverde Pareja

hvalverde@uma.es

Biología evolutiva molecular
Coordinación de espacios Web

José Carlos Dávila

davila@uma.es

Biología Celular -Neurobiología
¿Cómo funciona?

José María Blanco Martín

jmblanco@uma.es

Ecología de Sistemas
La imagen comentada

Juan Antonio García Ranea

ranea@uma.es

Bioinformática, Biología de Sistemas
Modelos en biología

Juan Carlos Aledo

caledo@uma.es

Bioquímica-Biología Molecular,
Energética de procesos biológicos
Vida y obra

Juan Carlos Codina

jccodina@uma.es

Microbiología, Educación Secundaria
Ciencias en el Bachillerato

Luis Rodríguez Caso

caso@eelm.csic.es

Técnicas de Laboratorio
Calidad y difusión

Ramón Muñoz-Chápuli

chapuli@uma.es

Biología del desarrollo y cardiovascular
Coordinación de edición electrónica- Foros
de la Ciencia

Raúl Montañez Martínez

raulemm@gmail.com

Biología sintética y de sistemas
Coordinación de diseño

Encuentros en la Biología
Revista de divulgación científica
(Indexada en Dialnet)

Edición electrónica:

www.encuentros.uma.es

Correspondencia a:

Miguel Ángel Medina Torres

Departamento de Biología Molecular y
Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

29071 Málaga

medina@uma.es

encuentrosenlabiologia@uma.es

Entidad editora:

Universidad de Málaga

Editado SIN FINANCIACIÓN INSTITUCIONAL

Depósito Legal: MA-1.133/94

ISSN (versión electrónica):

Periodicidad:

Encuentros en la Biología publica 4 números
ordinarios (uno por trimestre) y al menos 1
número extraordinario monográfico al año.

El equipo editorial de esta publicación no se
hace responsable de las opiniones vertidas
por los autores colaboradores.

Comité editorial asociado:

Alberto Martínez

almarvi@wanadoo.es

Educación Ambiental, E. para el Empleo

Alejandro Pérez García

aperez@uma.es

Microbiología, Interacción planta-patógeno

Alicia Rivera

arivera@uma.es

Neurobiología

Enfermedades neurodegenerativas

Félix López Figueroa

felix_lopez@uma.es

Ecología-Fotobiología, Cambio climático

Francisco Cánovas

canovas@uma.es

Fisiología Molecular Vegetal, Bioquímica y

Biología Molecular

Jesús Olivero

jesusolivero@uma.es

Zoogeografía, Biodiversidad animal

Juan Antonio Pérez Claros

johanny@uma.es

Paleontología

Margarita Pérez Martín

marper@uma.es

Fisiología Animal, Neurogénesis

María del Carmen Alonso

mdalonso@uma.es

Microbiología de aguas, Patología vírica de
peces

María Jesús García Sánchez

mjgs@uma.es

Fisiología Vegetal, Nutrición mineral

María Jesús Perlés

Mjperles@uma.es

Geomorfología, Riesgos medioambientales

M. Gonzalo Claros

claros@uma.es

Bioquímica-Biología Molecular y Bioinformática

Raquel Carmona

rcarmona@uma.es

Ecofisiología, Biorremediación

Salvador Guirado

guirado@uma.es

Biología Celular-Neurobiología

Notas de rectificación y disculpas

Estimado lector: La habitual sección *Editorial* de presentación de los contenidos del nuevo ejemplar de *Encuentros en la Biología* se transforma en este caso en *Notas de rectificación y disculpas* por los motivos que se exponen a continuación. El pasado 16 de Enero de 2015 uno de los Co-Editores Jefe de la revista recibió un correo electrónico del Profesor de Investigación del Departamento de Historia de la Ciencia del CSIC Dr. Miguel Ángel Puig-Samper en el que nos informaba que había detectado que el artículo "*Alexander von Humboldt, perfil de un sabio*" (*Encuentros en la Biología*, vol. 2 (nº 126): 61-66, 2009) contenía (sin citar convenientemente su procedencia) párrafos completos copiados de algunos de los trabajos publicados por él y por Sandra Rebok sobre figura del sabio prusiano, tanto en libros como en catálogos de exposiciones y artículos científicos y de divulgación, motivo por el cual solicitaba una nota de rectificación para dar crédito a los autores originales. Puestos en contacto con la autora del mencionado artículo, la misma presentó sus disculpas por su incorrecto proceder y nos suministró las siguientes citas como fuentes de su trabajo:

- <http://cvc.cervantes.es/ciencia/humboldt/>
- Humboldt y Darwin. Luis Chirino y David Yudilevich L., 1999. Ciencia al día internacional. luchai1@yahoo.com.
- De Humboldt a Darwin: una inflexión clave en la historia de la biogeografía. Gustavo Caponi. 2008. Scientiae Studia.
- Recopilación de las investigaciones electrofisiológicas llevadas a cabo en Venezuela durante el Siglo XIX. Francisco Herrera. 2009.
- Clemente Heimerdinger A, Briceño-Iragorry L, editores. Colección Razetti. Volumen VII. Caracas: Editorial Ateproca; 2009.p.311-354.

El enlace que aparece como primera referencia conduce al espacio del Centro Virtual Cervantes que recoge diversos materiales de la exposición *Un viaje del espíritu: Alexander von Humboldt en España* que el Instituto Cervantes mostró entre 2006 y 2008 en sus centros de Berlín, Bremen, Múnich, Mánchester, Londres y Viena. Los comisarios de dicha exposición fueron Miguel Ángel Puig-Samper y Sandra Rebok. Entre los materiales allí recogidos, se presenta una extensa biografía de Humboldt en catorce capítulos, de algunos de los cuales en efecto se habían copiado párrafos enteros en la biografía publicada en *Encuentros en la Biología* en 2009. Sirva esta nota de rectificación para atender la justa reivindicación del Profesor Puig-Samper. Además, anunciamos que ofrecimos al Prof. Puig.Samper (y él ha aceptado) reproducir la biografía de Humboldt que ha publicado en el *Diccionario Biográfico Español* de la *Real Academia de la Historia*. Pueden encontrar ese texto (acompañado de las ilustraciones que los editores de la revista añadieron a la biografía de Humboldt publicada en 2009) en la sección *Vida y Obra* del presente ejemplar.

Por otra parte, hacemos público que tiempo atrás uno de los componentes del Equipo Editorial de *Encuentros en la Biología* detectó que el artículo "*Ciencias para el mundo contemporáneo: una oportunidad para desarrollar la cultura científica ciudadana en el aula*" (*Encuentros en la Biología*, vol. 3 (nº 130): 45, 2010) había plagiado fragmentos completos de una normativa oficial y pública sobre la asignatura. En ese caso intentamos ponernos en contacto con la autora pero no obtuvimos respuesta alguna.

Tenga el lector la seguridad que no hay nada más ajeno a la intención y al espíritu que inspira esta revista (que editamos "a coste cero") que admitir los plagios. Sin duda, en estos casos, el error del equipo editor fue aceptar y publicar los artículos sin que incluyeran los habituales "Bibliografía citada" o "Lecturas para saber más". Extremaremos nuestro celo para que este tipo de circunstancias no se vuelva a repetir y anunciamos que a partir de ahora figurará en las instrucciones a los autores una mención explícita de que nos tomamos en serio el problema del plagio y de que todos los manuscritos enviados serán sometidos a una revisión por un programa detector de plagios antes de valorar su posible publicación en *Encuentros en la Biología*.

Aprovechamos la ocasión para presentar nuestras disculpas a quienes hayan visitado la URL www.encuentrosenlabiologia.es y se han sentido defraudados por sus todavía escasos contenidos. Una vez más hemos de apelar a la comprensión del lector para que entienda que esa iniciativa de futuro va avanzando mucho más lentamente de lo que deseamos por la sencilla razón de que no contamos con ningún personal de apoyo profesional para el mantenimiento de nuestra revista.

Finalmente, en el presente número 152 de *Encuentros en la Biología* el lector podrá encontrar, junto con varias de las secciones habituales, tres interesantes artículos de divulgación y la anunciada biografía de Humboldt, reproducida con permiso del autor de la correspondiente entrada en el *Diccionario Biográfico Español* de la *Real Academia de la Historia*.

Los Editores

Índice

Editorial: Notas de rectificación y disculpas	193
<i>La imagen comentada</i>	195
Monitor	196
<i>Foros de la ciencia</i>	196
SEBBM Divulgación	197
<i>La dependencia humana de los fertilizantes nitrogenados</i>	203
¿Cómo funciona? CRISPR/Cas9: La enésima revolución	207
<i>Procesos osmorreguladores en peces teleósteos</i>	211
Vida y obra: Alexander von Humboldt	215

ATENCIÓN! Cambios en las Instrucciones para los autores

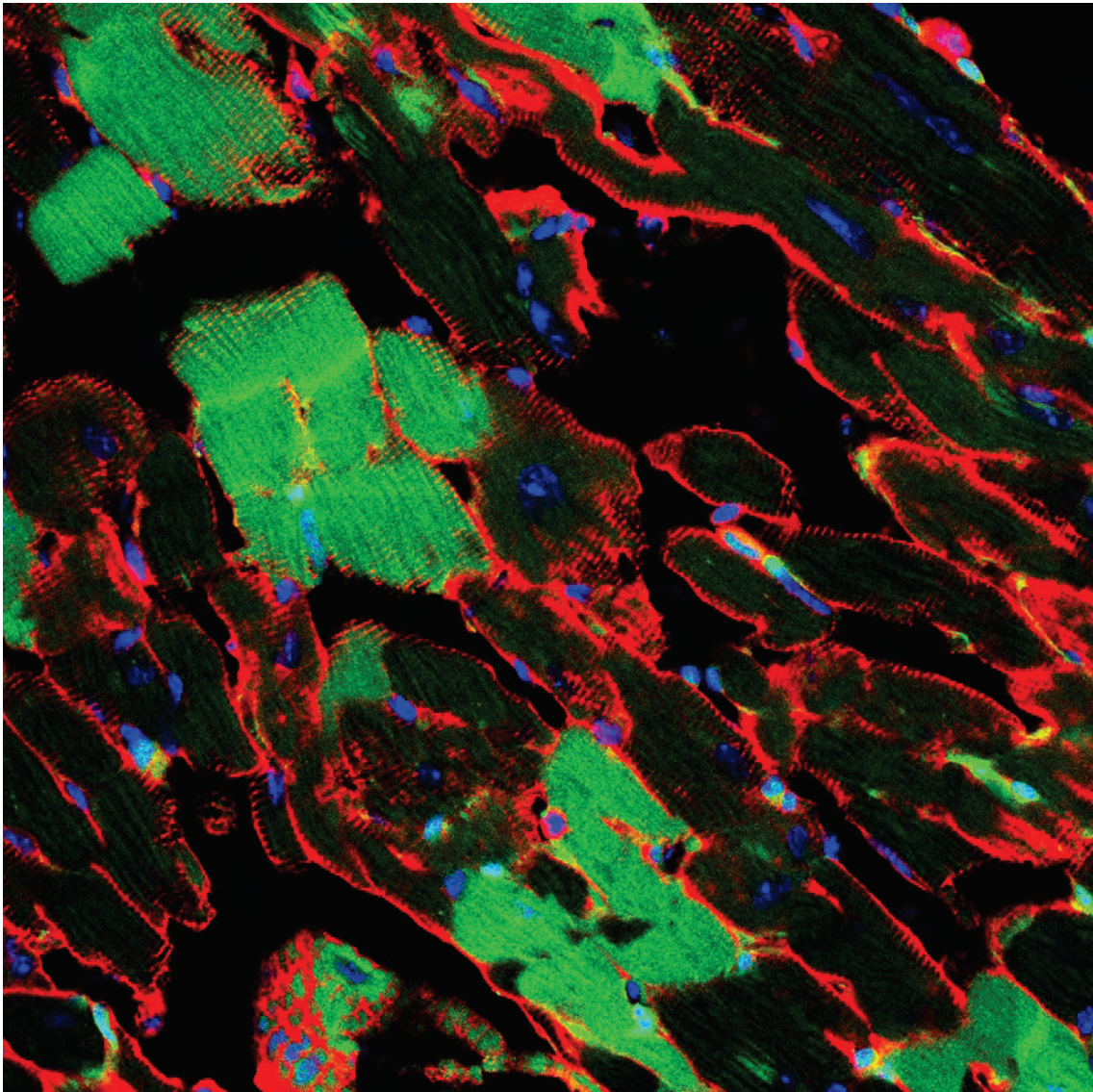
Instrucciones para los autores

La revista **Encuentros en la Biología** es una publicación que pretende difundir, de forma amena y accesible, las últimas novedades científicas que puedan interesar tanto a estudiantes como a profesores de todas las áreas de la biología. La revista tiene ISSN y eISSN y cumple los criterios *Latindex*. Sus contenidos completos (desde el número 26, publicado en noviembre de 1995) se pueden descargar en formato pdf y consultar en línea en <http://www.encuentros.uma.es/>. **Cualquier persona puede publicar en ella** siempre que cumpla las siguientes normas a la hora de elaborar sus originales:

- 1 Todos los manuscritos deberán ser inéditos o contarán con la autorización expresa del organismo que posea los derechos de reproducción. Además, deben tener alguna relación con el objetivo de la revista —los que simplemente reflejen opiniones se rechazarán directamente—. Esta revista se toma muy en serio el problema del plagio. Por ello, antes de su evaluación, todos los manuscritos recibidos serán sometidos a revisión por un programa detector de plagios.
- 2 El formato del documento puede ser TXT, RTF, SXW/ODT (OpenOffice) o DOC (Microsoft Word). Debido a las restricciones de espacio, la extensión de los mismos no debe superar las 1600 palabras; en caso contrario, el editor se reserva el derecho de dividirlo en varias partes que aparecerán en números distintos.
- 3 Cada contribución constará de un título, autor o autores, y su filiación (situación académica; institución u organismo de afiliación; dirección postal completa; correo electrónico; teléfono). Para diferenciar la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (*, #, ¶, †, ‡) después del nombre de cada autor.
- 4 Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas y redondilla (ABC o Abc). Los de los genes y las especies aparecerán en cursiva (*ABC*, *Homo sapiens*). También se pondrán en cursiva aquellos términos que se citen en un idioma que no sea el castellano.
- 5 Aquellos autores que no tengan el castellano como lengua materna pueden remitir sus manuscritos en inglés. Una vez aceptado, un resumen del mismo en castellano sería elaborado por el propio equipo editorial.
- 6 Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos, en blanco y negro puros, escalas de grises o color, deberán adjuntarse en ficheros independientes. Las figuras, las fórmulas y las tablas deberán enviarse en formatos TIFF, GIF o JPG, a una resolución de 300 dpi y al menos 8 bits de profundidad.
- 7 Cuando sean necesarias, las referencias bibliográficas (cuatro a lo sumo) se citarán numeradas por orden de aparición entre paréntesis dentro del propio texto. Al final del mismo, se incluirá la sección de Bibliografía de acuerdo con el estilo del siguiente ejemplo:
Einstein Z, Zwstein D, Dreistein V, Vierstein F, St. Pierre E. Spatial integration in the temporal cortex. *Res Proc Neurophysiol Fanatic Soc* 1: 45-52, 1974.
En caso de citar un libro, tras el título deben indicarse la editorial, la ciudad de edición y el año.
Si el texto principal no incluye referencias bibliográficas, se ruega a los autores que aporten 3-4 referencias generales "para saber más" o "para más información".
- 8 Aquellos que quieran contribuir a la sección **La imagen comentada** deberán remitir una **imagen original** en formato electrónico con una resolución mínima de 300 dpi y, en documento aparte, un breve comentario (de no más de **300** palabras) de la misma. Dicho comentario describirá la imagen, destacará la información relevante que aporta y/o especificará los procedimientos técnicos por los que se consiguió.
- 9 Los co-editores considerarán cualesquiera otras contribuciones para las diferentes secciones de la revista.
- 10 Envío de contribuciones: el original se enviará por correo electrónico a los co-editores (medina@uma.es, imperezp@uma.es) o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al contenido de su contribución. Aunque lo desaconsejamos, también se pueden enviar por correo ordinario (Miguel Ángel Medina, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España) acompañados de un CD. No se devolverá ningún original a los autores.
- 11 Los trabajos los leerán al menos un editor y/o un revisor externo para asesorar sobre la conveniencia de publicar el trabajo; también se podrán sugerir al autor las mejoras formales o de contenido que harían el artículo más aprovechable. La notificación se enviará por correo electrónico al autor que figure como corresponsal.



LA IMAGEN COMENTADA



195

Microfotografía de cardiomiocitos adultos obtenida con un microscopio láser confocal (LEICA, SP5).

El uso de la tecnología recombinante Cre/LoxP permite marcar de forma permanente se muestra una población singular de células musculares cardíacas diferenciadas a partir de una población de progenitores mesodérmicos que expresan el gen supresor del tumor de Wilms (células que expresan la proteína fluorescente amarilla, YFP, aquí codificada en verde). El aparato sarcomérico de todos los cardiomiocitos, con su característico patrón estriado, se ha identificado con anticuerpos contra con actina sarcomérica (rojo). Todos los núcleos celulares se han contrastados con DAPI, un agente intercalante del DNA.

Adrián Ruiz-Villalba

Becario Postdoctoral en la Universidad de Amsterdam, Holanda.

José María Pérez Pomares

Profesor Titular, Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga.

Método del año 2014:

El número de Enero de 2015 de la revista *Nature Methods* ha vuelto a publicar su selección del *Method of the Year*, título honorífico que en 2014 ha recaído en la microscopía de fluorescencia "de lámina de luz" (*light-sheet fluorescence microscopy*). Un Editorial, un *News Feature* y tres comentarios acompañan la celebración. Los títulos de los comentarios son: *Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology*, *Light-sheet*

imaging for systems neuroscience y *Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists*.

Enlace: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n1/index.html>

Ideas que cambian el mundo:

Desde hace varios años, la revista de divulgación científica *Investigación y Ciencia* publica una vez al año una selección de "Ideas que cambian el mundo". Den el número de Febrero de 2015, *Investigación y Ciencia* destaca diez nuevas ideas que cambian el mundo.

El "premio honorífico" de ser destacada como la primera de dichas nuevas ideas se lo lleva la revolucionaria técnica de edición genética precisa basada en el sistema *CRISPR/Cas9*, al cual precisamente dedicamos la sección *Cómo funciona* en el presente número de *Encuentros en la Biología*.

Enlace: <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/numeros/2015/2>

Foros de la ciencia

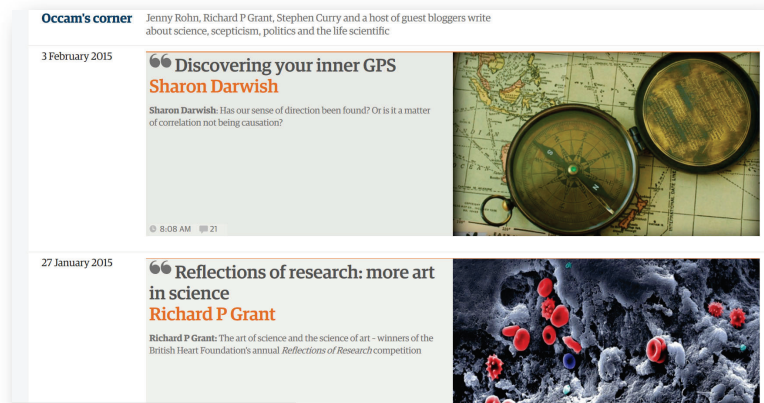


El rincón de Occam:

El diario británico *The Guardian*, uno de los principales periódicos del Reino Unido, cuenta con una excelente sección de ciencia (<http://www.theguardian.com/science>), que incluye noticias, comentarios críticos, vídeos, divulgación científica, enlaces a interesantes blogs sobre ciencia y el llamado "Rincón de Occam" (<http://www.theguardian.com/science/occams-corner>), en homenaje al monje franciscano Guillermo de Occam. En este rincón se acoge a destacados autores que escriben sobre "ciencia, escepticismo, política y vida científica". El resultado es una extraordinaria panorámica sobre el mundo de la ciencia, que recomendamos a los lectores de *Encuentros en la Biología*.

En el momento de redactar esta sección, el *Rincón de Occam* publica un comentario de Sharon Darwish sobre el control neurológico del sentido de la orientación (que le valió a John O'Keefe, May Britt Moser y Edvard Moser el Nobel de Medicina

y Fisiología el pasado año), describiendo recientes resultados en este campo. Aún más espectacular es el artículo de Richard Grant titulado "*Reflections of research: more art in science*", donde se muestran los resultados de una competición organizada por la *British Heart Foundation*, sobre imágenes biológicas que no sólo nos ilustran sobre aspectos biológicos, sino que además son intrínsecamente hermosas. Pero también podemos leer sobre las dificultades de los investigadores ante la crisis, epigenética, física, revistas de acceso abierto, recomendaciones de libros sobre ciencia y mucho más. El Rincón de Occam es una excelente opción para invertir unos minutos de nuestro cada vez más escaso tiempo libre, y es un buen modelo de lo que debería ser la divulgación no sólo de los resultados de la ciencia, sino también de la propia vida científica.





La Ciencia al alcance de la mano

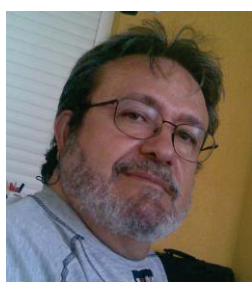
197

Tenemos el placer de presentar en la revista "Encuentros en la Biología" dos contribuciones seleccionadas entre las publicadas *on-line* en la sección «Divulgación: ciencia para todos» de la web de la SEBBM, sección auspiciada por el Programa de Divulgación de la SEBBM, una de las sociedades científicas más influyentes en España. Los originales de estos artículos aparecieron publicados en enero y febrero de 2015, respectivamente. Estos y más artículos podréis encontrarlos en:

(http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10).

Coordinadores: José Manuel Bautista, Amalia Díez, Teresa Giráldez, Almudena Porras, Isabel Varela Nieto y Enrique Viguera Mínguez.

Arginasa, un enzima clave en el destino de la respuesta inmune



Autor: Germán Soler
Catedrático (jubilado)
de Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad de Extremadura

Resumen: El enzima arginasa, descubierto hace 110 años, tiene desde hace unos 20 años una especial relevancia en la respuesta inmune al competir por la L-arginina con otro enzima, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Como resultado de esta competencia se producen una serie de metabolitos esenciales en la respuesta inmune: la prolina, en la reparación de tejidos; las poliaminas, por su participación en la división celular y la inmunosupresión; la N(ω)-hidroxi-L-arginina (NOHA), por su actividad inhibitoria de la arginasa; y el NO por sus innumerables efectos fisiológicos, entre otros en el sistema inmune -por su acción citotóxica frente a células tumorales y microorganismos- y en la inflamación. Todos ellos hacen que esta encrucijada metabólica sea clave en el destino de la respuesta inmune.

Summary: The enzyme arginase discovered 110 years ago, has taken a particular relevance in the last 20 years with respect to the immune response since it competes for L-arginine with another enzyme, the inducible nitric oxide synthase (iNOS). As a result, a number of essential metabolites for the immune response are generated: proline, in tissue repair; polyamines, for his role in cell division and immunosuppression; N(ω)-hydroxy-L-arginine (NOHA) for its inhibitory activity on arginase; and NO, for its many physiological effects, among others in the immune system - because its cytotoxic activity against tumor cells and microorganisms- and in inflammation. All of them make, of this metabolic crossroad, a key for the fate of the immune response.

Hace ya 110 años se habló por primera vez de la enzima arginasa (1) pero no fue hasta 1932 que Krebs y Henseleit descubrieron su contribución al ciclo de la urea. Hasta hace unos 20 años la arginasa era considerada una enzima que únicamente participaba en el ciclo de la urea y que producía ornitina para cerrar el ciclo y urea como vehículo para la desintoxicación del nitrógeno amínico del organismo (2). En la actualidad, estudios realizados en macrófagos y en células mieloides en general han permitido considerar la arginasa como una enzima que interviene en multitud de funciones celulares muy diversas, que van desde regular la producción de óxido nítrico (NO), con sus innumerables efectos fisiológicos, hasta participar en respuestas inflamatorias, estrés oxidativo y control de la presión arterial. La arginasa es además diana tanto en el tratamiento de la isquemia-reperusión del infarto de miocardio, como en fertilidad. Así mismo este enzima está involucrada en la citotoxicidad sobre células normales, cancerosas o microorganismos (3). El hecho de que la arginasa sea inducible por gran cantidad de citoquinas TH1 (IL-4, IL-10 e IL-13) y por lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS), demuestra su papel central en la respuesta inmune e inflamatoria. Además, la arginasa es fundamental en procesos de reparación y proliferación tisular; pues la L-ornitina que se produce puede seguir dos destinos, uno a través de la enzima ornitina aminotransferasa (OAT) hacia L-prolina, que es fundamental en la composición del colágeno; y el otro mediante la ornitina descarboxilasa (ODC) para la síntesis de poliaminas.

El control de la expresión génica de la arginasa en diferentes tejidos y células regula la disponibilidad de arginina para la producción de óxido nítrico (NO), molécula clave en diferentes procesos celulares, incluida la respuesta inmune, y que se genera por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Como intermediario de esta reacción se produce N(ω)-hydroxy-L-arginine (NOHA), que a su vez es un potente inhibidor de la arginasa. De esta manera la producción de NOHA garantiza que no se consuma L-arginina por la arginasa, sino que vaya por la vía iNOS. La enzima iNOS es inducida por las citoquinas TH2 (IFN γ , TNF α y TNF β) y por LPS.

Existen dos tipos de macrófagos, los M1, que promueven la actividad inflamatoria; y los M2, que favorecen la reparación de tejidos y disminuyen la inflamación. La opcionalidad de estas funcionalidades en macrófagos depende del estímulo de ambos tipos de citoquinas (TH1 y TH2) que, como hemos visto, inducen ambas enzimas, arginasa e iNOS, respectivamente, de forma que la inducción diferencial controla el equilibrio funcional de la actividad de los macrófagos. Así, por ejemplo, la exposición de cultivos de macrófagos a inductores de iNOS extingue su habilidad para responder a los inductores de la arginasa. Por el contrario, su exposición a inductores de la arginasa agota su capacidad de respuesta a inductores de iNOS. Estas observaciones son consistentes con una competición de ambas enzimas por el sustrato principal, la L-arginina, pero también con una inhibición recíproca en la inducción de ambas enzimas o incluso con una combinación de ambos fenómenos (5,6). Existe además una vía de reciclaje de L-arginina a partir de la L-citrulina, mediante dos enzimas de ciclo de la urea, la argininosuccinato sintetasa (ASS) y la argininosuccinasa (AS). Como las poliaminas son inhibidoras de la iNOS, la acumulación de las mismas inhabilita la parte del mecanismo de defensa inmune basado en el efecto citotóxico del NO. La urea, producida por la arginasa, al ser inhibidora de la iNOS puede producir esta misma inhabilitación (4). En este contexto, debemos enfatizar que la organización de ciclos metabólicos asociados a procesos de diversidad funcional celular demuestra el elevado control de sustratos claves como la L-arginina para permitir a la célula optar por respuestas adecuadas al entorno. Muchas células de mamíferos como neutrófilos, granulocitos, eritrocitos, hepatocitos, miocitos cardiacos, *natural killer*, células endoteliales y células del músculo liso, entre otras, presentan actividad de arginasa y de iNOS a diferentes niveles, lo cual en combinación con las diferentes formas de activar estas enzimas, confieren al metabolismo de la L-arginina la capacidad de actuar como una encrucijada clave en el destino funcional celular (3).

En el sistema inmune este efecto es decisivo. La inducción de la arginasa en células mieloides murinas, como por ejemplo macrófagos, por citoquinas TH2 y agentes inflamatorios participa en una gran variedad de enfermedades inflamatorias por regulación negativa de la síntesis de NO, inducción de fibrosis y regeneración tisular. También, la depleción de la L-arginina, mediada por arginasa suprime la respuesta inmune de las células T, dando lugar a un mecanismo fundamental de inmunosupresión asociada con los procesos inflamatorios.

Es por todo lo que antecede, que la interferencia farmacológica del metabolismo de la L-arginina ha sido propuesta como una nueva y prometedora estrategia para diferentes tratamientos como el cáncer (la depleción de L-arginina del entorno del tumor favorece su curación por ser un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas) o la autoinmunidad u otras reacciones inmunes no deseadas como las alergias, ya que al disminuir la accesibilidad a la arginina se frena la proliferación de linfocitos T (6,7).

199

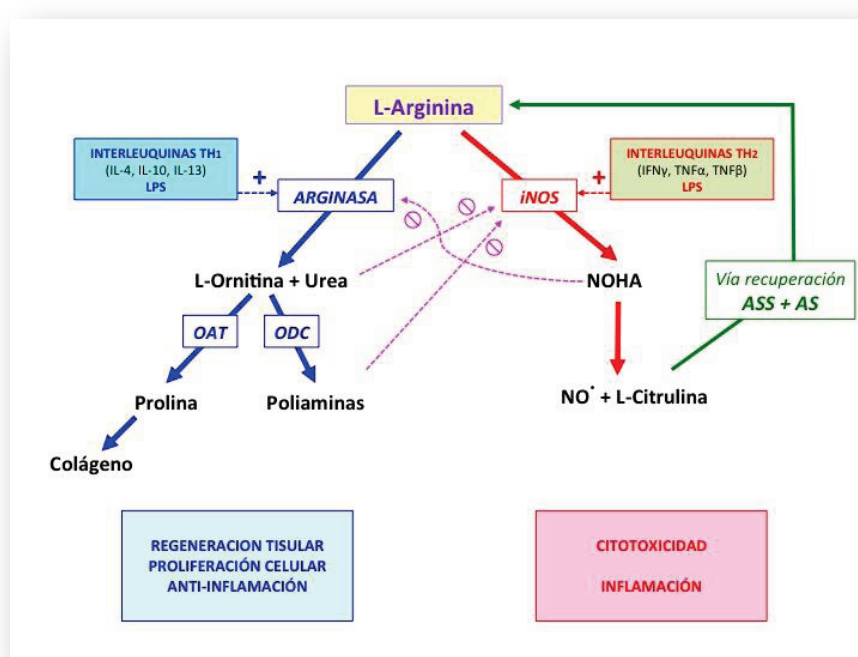


Figura 1: Encrucijada de los dos posibles destinos de la L-arginina en macrófagos del sistema inmune a través de la arginasa o de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El primero favorece una función proliferativa, antiinflamatoria, y regenerativa, mientras que el segundo activa los mecanismos de defensa inflamatoria y citotóxica. Las abreviaturas e intermediarios se indican en el texto principal.

SEMBLANZA BIOGRÁFICA DEL AUTOR

Germán Soler Grau se licenció en Farmacia por la Universidad de Granada en 1973 y se doctoró en la Universidad Complutense de Madrid en 1978 bajo la dirección del Dr. Manuel Ruiz-Amil. Realizó una estancia postdoctoral en el Departamento de Bioquímica del *Medical College of Virginia* entre 1981 y 1983 con Marino Martínez-Carrión donde trabajó en el receptor de la acetilcolina. Su investigación se ha centrado en estudios estructurales, funcionales e inmunológicos de la arginasa. Más recientemente ha participado también en el estudio de la enfermedad de Parkinson. En la actualidad es catedrático jubilado de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura, donde impartió docencia desde 1984 hasta 2007 en la Facultad de Veterinaria. Es autor de más de 50 trabajos en artículos de investigación.

REFERENCIAS

- 1.- KOSSEL A. y DAIKIN H.D. (1904) Über die arginase. Hoppe-Seylers Zeitschrift F. Physiol. Chemie., XLV, 322-331
- 2.- BERG J.M., STRYER L. y TYMOCZKO J.L. (2007) Bioquímica. Ed. Reverte.
- 3.- YANG Z., MING X.F. (2014) Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Immunology* 5, 533.
- 4.- MUNDER M. (2009) Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal Pharmacology* 158, 638-651.
- 5.- MODOLELL M., CORRALIZA I.M., LINK F., SOLER G. Y EICHMANN K. (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal Immunology* 4, 1101-14.
- 6.- MUNDER M., EICHMANN K., MORAN JM., CENTENO F., SOLER, G. Y MODOLELL M. (1999) TH1/TH2-Regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal Immunology* 163, 3771- 3777.
- 7.- THOMAS AC AND MATTILA JT. (2014) Of mice and man: arginine metabolism in macrophages. *Frontier Immunology* 5:479.

200



Autora: Liset Menéndez
de la Prida
Laboratorio de Circuitos
Neuronales, Instituto Ca-
jal de Madrid

De disparos y oscilaciones (Premio Nobel Medicina 2014)

Resumen: El Premio Nobel de Medicina del año 2014 ha galardonado el trabajo de John O'Keefe y Edvard y May-Britt Moser por sus descubrimientos del sistema neuronal que señala nuestra posición en el espacio, las células de lugar del hipocampo y las células *grid* (o de retícula) de la corteza entorrinal ¿Qué son estas células y por qué es este descubrimiento tan importante?

Summary: *The Nobel Prize in Medicine was awarded in 2014 to John O'Keefe and Edvard and May-Britt Moser for their discoveries on the neuronal system indicating our position in space, hippocampal place cells and grid cells of entorhinal cortex. What are these cells and why is this discovery so important?*

Similar a los campos receptivos sensoriales, cuando caminamos por una habitación recorriendo el espacio, las neuronas del hipocampo y la corteza entorrinal disparan potenciales de acción en función de la posición que ocupamos. Estos campos de lugar emergen de una compleja interacción de la actividad neuronal que combina información de diversos estímulos externos e internos. Las células *grid*, que están localizadas en el borde interno del lóbulo temporal, disparan cada vez que nos desplazamos distancias regulares en el espacio como señalizando nodos imaginarios de una retícula que cubre la habitación (Fig.1a). Las células de lugar en el hipocampo reciben esa información de la corteza entorrinal y, puesto que en un punto dado del espacio habrá una combinación específica de nodos activados y apagados, el disparo resultante de la neurona va a reflejar esta dinámica. Estos campos de lugar son estables si no cambian la disposición de las pistas externas a lo largo del experimento (Fig.1b). El hipocampo, una región del cerebro especialmente involucrada en el aprendizaje y la memoria, está dotado por tanto de un sistema neuronal que señala la posición espacial. ¿Qué significa todo esto? John O'Keefe publicó su primer artículo sobre las células de lugar de la región CA1 del hipocampo en el año 1971 (1). En 1978 salió a la luz el libro *The hippocampus as a cognitive map*, donde junto a Lynn Nadel desarrolló el pensamiento que ha dominado los estudios funcionales del hipocampo en los últimos 35 años (2). Dentro de este marco conceptual, el hipocampo alberga un mapa cognitivo que permite resolver complejas tareas, como localizar una plataforma hundida, reconocer objetos ya vistos, diseñar estrategias de escape y búsqueda de alimento.

Desde entonces, se han identificado las células de dirección (*head-direction cells*) por James Ranck y Jeff Taube (3), las células de borde por Neil Burgess y el propio O'Keefe (4) y las células *grid* por los Moser (5). Se trata por lo tanto de un sistema completo de codificación, que utilizando información idiotética o interna (vestibular, propioceptiva) y pistas externas es capaz de situarnos en el espacio. Pero, puesto que el espacio es donde vivimos y esas pistas externas y todo lo que acontece con ellas evoluciona y no es rígido, este mismo sistema de codificación también representa los cambios y contingencias que ocurren y eso da lugar a una representación compacta del espacio y el tiempo. Dado que las sinapsis entre neuronas activas tienden a fortalecerse, y aquellas entre neuronas pobremente co-activadas tienden a debilitarse, la representación cognitiva que emerge de este sistema neuronal tiende a establecerse como trazas de memoria de una experiencia concreta.

201

¿Quién organiza estos recuerdos? ¿Cómo conseguir que no se mezclen y que se preserve la representación de un recorrido o una vivencia tras otra? Mientras avanzamos por el espacio todas las neuronas del hipocampo están recibiendo *inputs* de los núcleos del tronco del encéfalo, de la corteza entorhinal y las neuronas vecinas que despolarizan su potencial de membrana de manera rítmica. Estas oscilaciones del potencial de membrana, que se registran extracelularmente (Fig.1c), generan ventanas de oportunidad para el disparo neuronal, porque acercan el potencial al umbral de disparo (6). Cuando atravesamos los diferentes campos de lugar de cada célula, los disparos celulares se suceden según el orden del recorrido. Unas células disparan antes que otras y lo hacen en esas ventanas cíclicas de oportunidad que se registran mientras el animal explora el entorno. Esto agrupa temporalmente los disparos de eventos que ocurren próximos en el espacio y codifican el orden de los sucesos. El trayecto A,B,C,D y el trayecto C,D,A,B activará diferentes trazas de memoria. Estas trazas, luego son reactivadas durante las fases de sueño lento, cuando se registran oscilaciones rápidas de entre 80-200 Hz (Fig.1c). Las oscilaciones de la actividad cerebral ordenan por tanto los disparos en espacio y tiempo. Y espacio y tiempo conforman los recuerdos, la memoria (7). Por esto, el sistema de células de lugar, de borde, de dirección y de retícula conforma la estructura mental de los recuerdos (8).

Los próximos años aún verán avances espectaculares en el estudio del sistema neuronal de la memoria. El reto será encontrar los atajos para reparar los daños que se producen en este sistema cuando envejecemos, o en enfermedades neurodegenerativas que afectan a la estructura del mapa cognitivo. En la epilepsia del lóbulo temporal, una enfermedad que altera los circuitos del hipocampo y la corteza entorhinal, la estabilidad de los campos de lugar está seriamente comprometida. Esta desestabilización de las trazas de memoria está especialmente afectada por las crisis epilépticas, y provoca importantes disfunciones cognitivas (Fig.1d). Estudiando estas alteraciones del disparo y la distorsión de las oscilaciones responsables de organizarlo y almacenarlo (9,10), podemos comprender mejor las bases neuronales de la disfunción cognitiva e idear formas de reparación.

SEMBLANZA BIOGRÁFICA DE LA AUTORA

Desde 2008, la Dra. Liset Menéndez de la Prida lidera el Laboratorio de Circuitos Neuronales (<http://www.hippocircuitlab.es>) en el Instituto Cajal en Madrid. El principal objetivo de su laboratorio es entender la función de los circuitos hipocampales y para-hipocampales en el cerebro fisiológico y epiléptico. Su grupo está interesado en comprender cómo se producen los complejos patrones de actividad eléctrica cerebral (incluyendo oscilaciones y actividad poblacional) con un especial énfasis en las reglas celulares y sinápticas que gobiernan la dinámica de circuitos. El laboratorio de la Dra. Menéndez de la Prida está reconocido como un líder mundial en entender los mecanismos básicos de los ritmos de altas frecuencias (o HFO, del inglés) detectados en el cerebro epiléptico y ha propuesto nuevos marcos para entender los procesos subyacentes. En los últimos cuatro años, el grupo ha incorporado con éxito nuevas y sofisticadas técnicas de registro crónico acopladas al estudio del rendimiento cognitivo y está actualmente investigando el efecto funcional de la distorsión de ritmos cerebrales en epilepsia. Además, ejecuta un rol importante en el desarrollo de innovadoras aproximaciones tecnológicas, incluyendo una nueva sonda integrada para la liberación de fármacos simultáneo al registro cerebral, que se encuentra en pruebas preliminares para aplicaciones traslacionales en la investigación de la epilepsia.

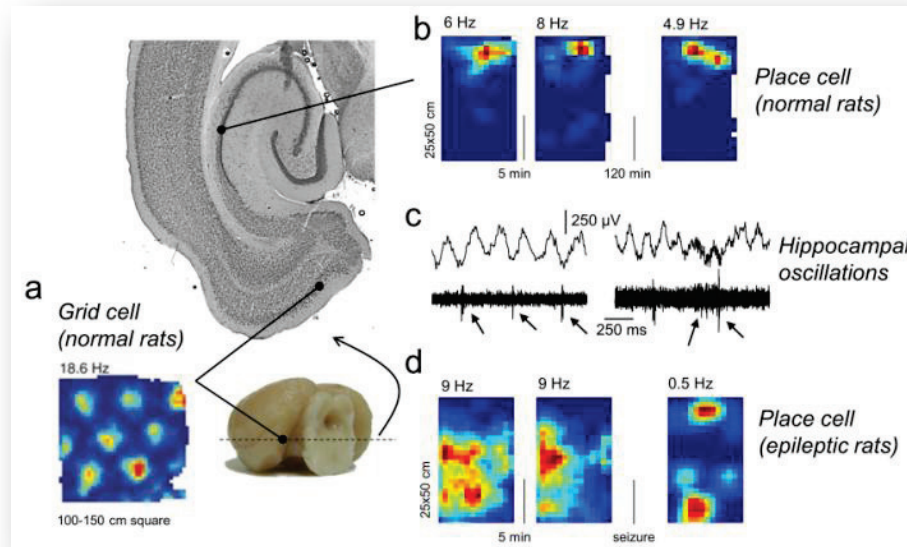


Figura 1: a, Ejemplo de célula *grid* registrada en corteza entorhinal. Tomado de Bonnevie *et al. Nature Neuroscience* 16, 309-317 (2013). El animal explora una arena cuadrada de 100-150 cm de lado y el registro electrofisiológico de una célula muestra incrementos de disparo (en Hz) hasta un máximo de 18.6 Hz representado por colores (rojo: máximo, azul: mínimo). El esquema del cerebro y la sección horizontal muestra la posición aproximada de la zona registrada en corteza entorhinal. b, Ejemplo de célula de lugar registrada en la región CA1 de ratas normales. Se trata de una arena rectangular de 25 x 50 cm. Nótese la estabilidad del campo de lugar de esta célula en intervalos de minutos y horas. c, Oscilaciones de la actividad extracelular (arriba) y los disparos de una célula aislada (flechas) durante un episodio de exploración en el que se aprecia el ritmo theta (4-10 Hz; izquierda) y durante un episodio de ritmo de altas frecuencias (80-200 Hz; derecha). Nótese la relación de fase de los disparos con el ciclo oscilador. d, Ejemplo de una célula de lugar registrada en ratas epilépticas. Nótese la dispersión de los campos, y la inestabilidad entre sesiones, así como el efecto de una crisis epiléptica. Datos en b-d obtenidos por Jorge Brotons-Mas y Liset Menéndez de la Prida.

REFERENCIAS

- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971, 34(1):171-5.
- O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map.* Oxford University Press 1978.
- Taube, JS; Muller RU, Ranck JB Jr. "Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis." *J. Neurosci.* 1990, 10 (2): 420-435.
- O'Keefe, J.; Burgess, N.. "Geometric determinants of the place fields of hippocampal neurons". *Nature* 1996, 381 (6581): 425-428.
- Hafting, T.; Fyhn, M.; Molden, S.; Moser, M. -B.; Moser, E. I. "Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex". *Nature* 2005, 436 (7052): 801-806
- Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science.* 2004, 304(5679):1926-9.
- Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci.* 2013, 16(2):130-8.
- <http://hippo-circuitlab.com/2014/10/la-estructura-del-recuerdo/>
- Inostroza M, Brotons-Mas JR, Laurent F, Cid E, de la Prida LM. Specific impairment of "what-where-when" episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 2013, 33(45):17749-62.
- Jefferys JG, Menendez de la Prida L, Wendling F, Bragin A, Avoli M, Timofeev I, Lopes da Silva FH. Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog Neurobiol.* 2012, 98(3):250-64.

La dependencia humana de los fertilizantes nitrogenados y sus consecuencias

Fernando de la Torre y Rafael A. Cañas

Investigadores contratados. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias.

Universidad de Málaga

fdelatorre@uma.es rcanas@uma.es

En el actual contexto demográfico, con un crecimiento desmesurado de la población mundial y un continuo incremento del nivel de vida en los países especialmente poblados, cubrir las necesidades y demandas alimenticias de la humanidad se ha convertido en un reto extraordinario. Con una proyección de natalidad media, se estima que la población mundial crecerá desde los 7.000 millones actuales a los 9.500 millones en el año 2050 (Figura 1), con lo

que las necesidades alimenticias de la población también crecerán, al menos, en la misma proporción. Dejando a un lado otros aspectos de índole diversa, podemos decir que es necesario un aumento de la producción agrícola mundial para cubrir estas futuras necesidades. En los últimos 50 años el aumento de las demandas alimenticias de la población ha podido ser cubierto gracias a la llamada "revolución verde" (RV), que se desarrolló principalmente entre 1965 y

203

masiva de técnicas de cultivo y de las variedades cultivadas. Se ha mejorado extraordinariamente la irrigación, el control de las plagas mediante pesticidas y la fertilización del suelo. Esto ha permitido el aumento del rendimiento por hectárea y la producción agrícola total, lo que ha conllevado una reducción del hambre, la pobreza y ha facilitado el acceso a los alimentos a un mayor número de personas. Además, la RV ha limitado el aumento de la superficie cultivada en el mundo; sin ella la producción de alimentos sería un 20% menor en los países en desarrollo, lo que a su vez habría creado la necesidad de cultivar de 20 a 25 millones de hectáreas adicionales (Figure 2). Pero la RV también ha traído consecuencias indeseables que

son producto de una aplicación no controlada de sus métodos. La aplicación abusiva de las técnicas de la RV y la extensión de los cultivos a zonas poco apropiadas, cuando la estrategia de la RV estaba basada en la intensificación de la agricultura en las áreas más favorables, han acarreado una serie de problemas medioambientales. Estos se pueden resumir en una excesiva captación de los recursos hídricos, la degradación

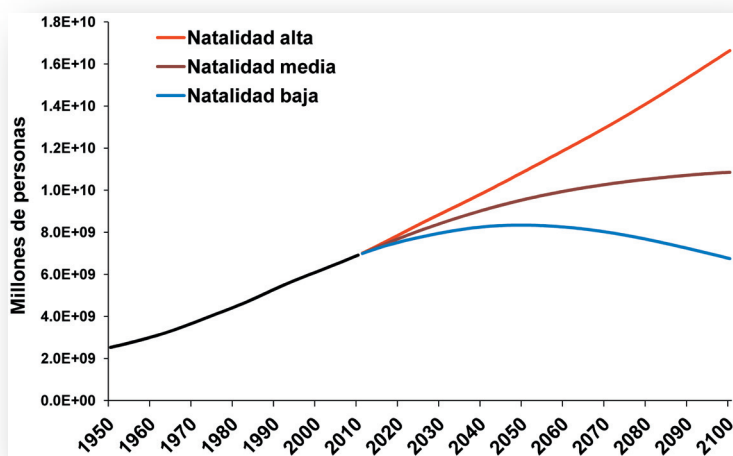


Figura 1: Medida de la población mundial hasta 2012 y proyecciones de la población mundial hasta 2100. Datos de World Population Prospects: The 2012 Revision, Naciones Unidas, <http://esa.un.org/unpd/wpp/index.htm>

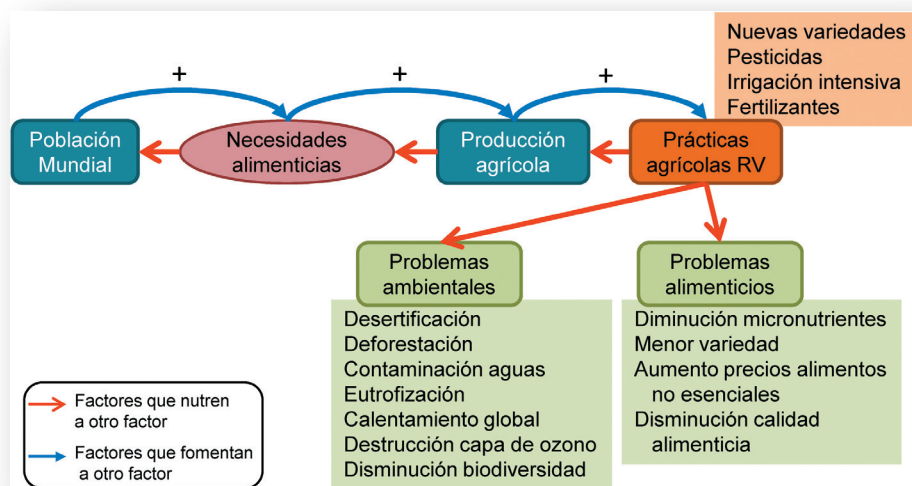


Figura 2: Esquema del flujo de producción de alimentos causado por el aumento de la población humana y algunas de sus consecuencias.

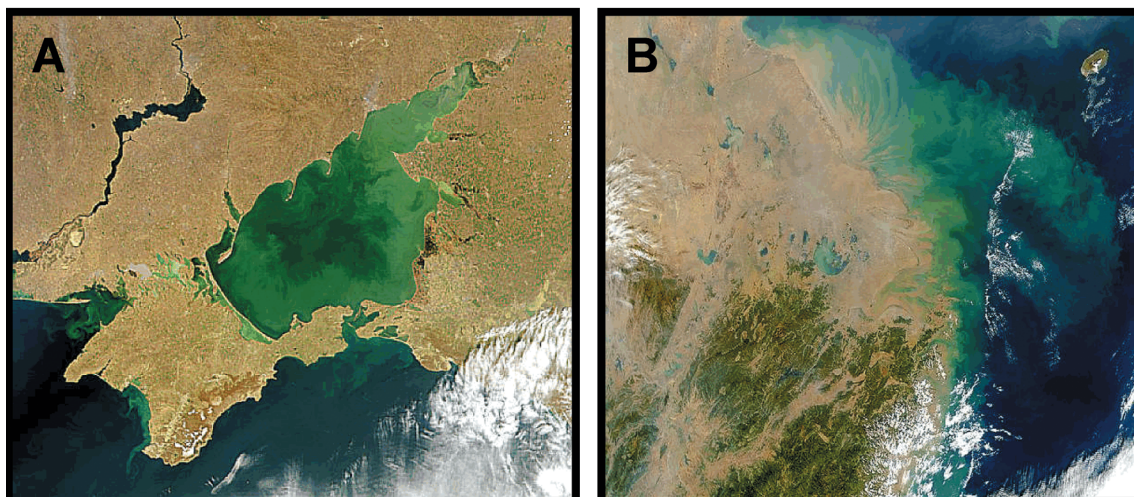


Figura 3: Fotografías tomadas por la NASA desde un satélite de la eutrofización en el mar de Azov (A) y en la desembocadura del río Yangtze (B). A mayor color verde mayor proliferación de algas debido al proceso de eutrofización.

del suelo y la contaminación de las aguas subterráneas por productos químicos (1).

El uso adecuado de fertilizantes es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la agricultura en la actualidad. Si bien los fertilizantes promueven el crecimiento y la producción de los cultivos, en exceso son responsables de graves problemas ambientales como la emisión de gases de efecto invernadero, daños a la capa de ozono (nitrito principalmente), así como la acidificación y contaminación del suelo y subsecuentemente de las aguas, lo que provoca procesos de eutrofización (Figura 3). Esto ha contribuido, además, a la reducción de la biodiversidad y al malfuncionamiento de los ecosistemas no agrícolas. Por otra parte los fertilizantes también representan el mayor coste asociado a la producción de muchos cultivos, lo que aumentará a medida que disminuyan los recursos para la síntesis de los fertilizantes.

La mayoría de los fertilizantes que se emplean hoy en día son ricos en formas inorgánicas de nitrógeno (N), fundamentalmente nitrato y amonio, ya que el N es uno de los mayores elementos limitantes para el crecimiento de las plantas. El N es un macronutriente que forma parte de las principales moléculas orgánicas: ácidos nucleicos, proteínas, y también clorofilas en los vegetales. Su participación en el metabolismo de las plantas es tan importante que la asimilación de carbono en la fotosíntesis está limitada por la disponibilidad de N. Por todo esto, el estudio del metabolismo del N (captación, asimilación y gestión) en las plantas se ha convertido en un tema fundamental para la poder conseguir una agricultura más "sostenible". Así, en el año 2009 *The Economist* publicó un

artículo donde se asimila la mejora de la eficiencia del uso del N de los cultivos (NUE, en inglés) a una nueva RV (2). La NUE es un carácter agronómico cuantificable que incluye la captación y la asimilación y gestión del N por parte de un cultivo encaminado a la producción, por ejemplo, de grano o biomasa. Simplificando podríamos decir que es el cociente entre la producción del cultivo y la cantidad de N suministrado. La NUE es muy dependiente del genotipo y, fundamentalmente, de la interacción del genotipo con el medio. Una misma variedad de cultivo puede tener comportamientos muy diferentes dependiendo de los niveles de fertilización. Variedades con excelentes rendimientos en entornos con bajos niveles de N pueden no ser convenientes para suelos ricos en N (3).

Por otra parte, se ha comprobado que el uso de fertilizantes nitrogenados ha alcanzado su máxima eficacia. Añadir más fertilizante del que se viene usando sobre las actuales variedades de cultivo no aumenta su producción agrícola. De hecho, en la Unión Europea se ha estancado el uso de fertilizantes sin una disminución de la producción. Incluso hay países como Dinamarca o Japón que han conseguido mantener la producción disminuyendo el aporte de fertilizantes al suelo (Figura 4) (4). Esto no ha sucedido aún en países en desarrollo, en los que la cantidad de fertilizantes nitrogenados aportados al suelo es mucho mayor de la necesaria para alcanzar una producción óptima: este es el caso de China, donde se podría disminuir su uso entre un 30% o un 50% sin una pérdida apreciable de producción. La reducción en el aporte de N se puede llevar a cabo gracias al uso de técnicas agrícolas conocidas como "buenas prácticas

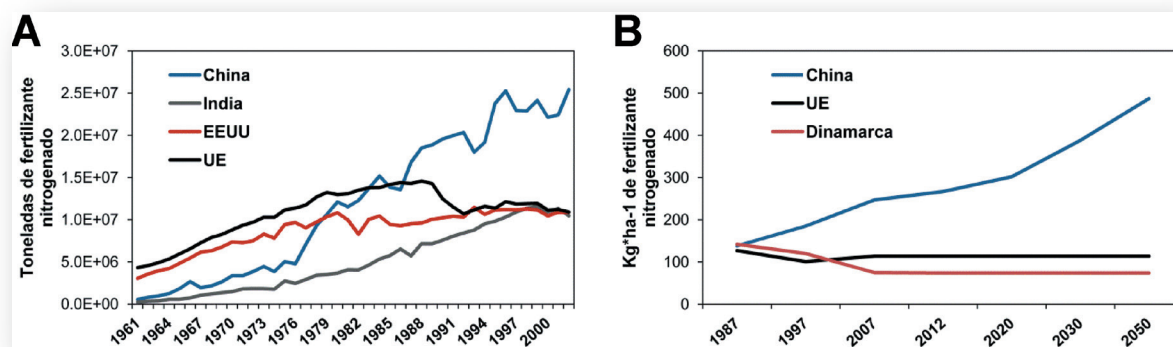


Figura 4: Consumo de fertilizante en los principales países consumidores (A) y consumo por hectárea en la UE, Dinamarca y China (B).

de manejo de nutrientes” (BNMPs en inglés). Estas se pueden resumir en cuatro tipos principales: la fuente de N, la cantidad, el tiempo y el lugar adecuados. Un ejemplo es la monitorización del estado nutricional de los cultivos mediante estimaciones en tiempo real gracias a la teleobservación de la luz visible reflejada desde el dosel vegetal en imágenes hiperespectrales obtenidas por satélite, que permiten un seguimiento espacial y temporal de la cantidad de N en hojas. Esto permite optimizar el aporte de N a un campo de cultivo. Otra técnica alternativa es el cultivo conjunto de plantas no fijadoras de N atmosférico con especies fijadoras para incrementar el contenido de N del suelo (3,4), que es una práctica tradicional todavía se mantiene en regiones como Asturias, donde existen lugares en los que se cultiva en el mismo campo maíz con habas (fabes).

A pesar de todo, la dinámica poblacional del planeta hace que estas prácticas sean necesarias pero insuficientes para cubrir las futuras necesidades alimenticias. Esto es debido a que no permitirían un incremento de la producción, que quedaría estancada con las actuales variedades de cultivo. Por ello es necesario un mayor esfuerzo en la obtención de nuevas variedades con una mayor producción y una NUE mejorada. En este sentido, se han hecho avances mediante mejora genética clásica (cruce y selección) de nuevas variedades, principalmente sobre los cereales más cultivados (arroz, maíz y trigo). El resultado suelen ser variedades que presentan un incremento en su NUE gracias a una mayor producción, pero que no presentan incrementos en la concentración de N interna (4). Aunque se hayan venido cosechando éxitos gracias a la mejora genética clásica, existe el convencimiento de que estas técnicas están alcanzando su apogeo y no se esperan grandes avances en la aplicación de esta tecnología en un futuro próximo.

Por ello, se están haciendo intentos por obtener nuevas líneas gracias a las modernas técnicas de mejora genética, organismos genéticamente modificados (OGM, transgénicos). Así, se ha pensado que conocer las funciones y las relaciones de las enzimas directamente encargadas del transporte, asimilación y gestión del N en las plantas podría facilitar la comprensión de la NUE y por lo tanto seleccionar los genes adecuados para la generación de transgénicos con una NUE mejorada (Figura 5). En este sentido, se han hecho diversos estudios sobre transgénicos para los principales genes del metabolismo del nitrógeno desde su captación del suelo hasta su asimilación y reciclaje (3). Muy esperanzador fue el resultado obtenido por el Profesor Allen Good con transgénicos de arroz para un gen que codifica la alanina aminotransferasa (AlaAT, EC: 2.6.1.2) (5). Pero este resultado no ha podido ser llevado finalmente a una línea comercial como confirmó en 2011 en un *Workshop* de la UNIA en Baeza (*Nitrogen use efficiency in plants: toward models of sustainable agriculture*). Parece ser que el efecto sobre la NUE sólo es observable en determinados fondos genéticos y en las variedades e híbridos usados comercialmente no se ha podido tener un resultado satisfactorio. También se han obtenido buenos resultados con genes codificantes para la glutamina sintetasa (GS, EC: 6.3.1.2), que es la enzima responsable de la asimilación del N inorgánico en las moléculas orgánicas, pero también del reciclaje del N liberado en forma de amonio en diversos procesos metabólicos como la fotorrespiración o la síntesis de lignina. Por ello estos transgénicos presentan mayor producción de grano en plantas de cultivo como el maíz o de biomasa en árboles de interés maderero como el chopo (3). A pesar de ello no se han llegado a comercializar líneas transgénicas de estas plantas.

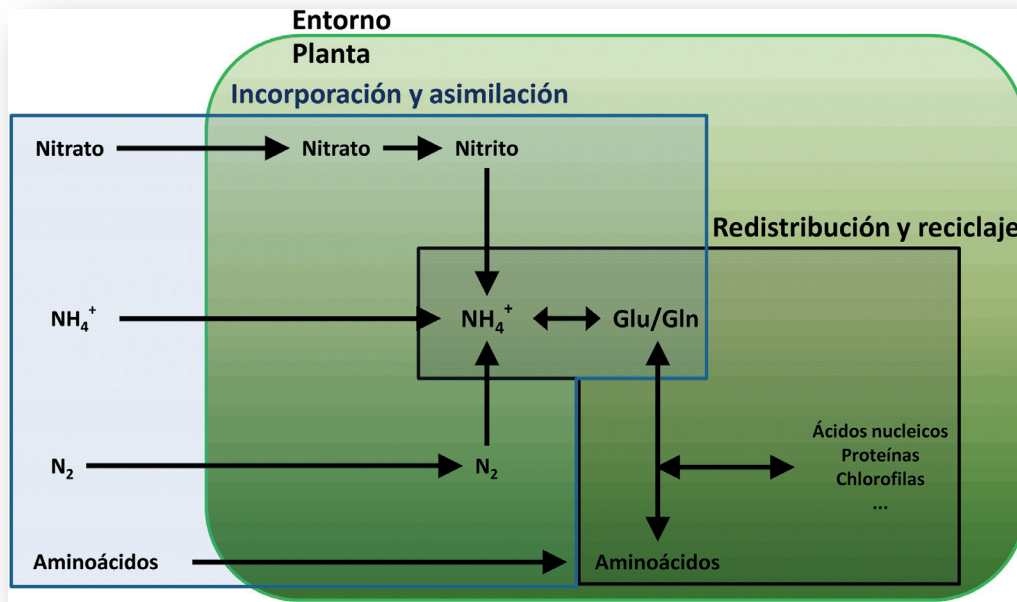


Figura 5: Esquema simplificado de la captación y gestión del nitrógeno en una planta.

En conclusión, podemos decir que, ante las apocalípticas perspectivas que se ciernen sobre la humanidad tanto desde el punto de vista alimenticio como medioambiental, se han de tomar una serie de medidas para mejorar la producción de los cultivos. Junto con unas mejores

prácticas agrícolas para limitar el uso de fertilizantes nitrogenados se han de obtener variedades de cultivo con mejores rendimientos y NUE en una huida hacia delante hasta que se establezca o se reduzca la población humana

Bibliografía citada:

- (1) Pingali PL. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:12302-12308, 2012.
- (2) Ridley M. The new NUE thing. Nitrogen-use efficiency, the next green revolution. *The Economist*. The World in 2010. <http://www.economist.com/node/14742733>, 2009.
- (3) Xu G, Fan X, Miller AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol*. 63:153-182, 2012.
- (4) Good AG, Beatty PH. Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *PLoS Biol*. 9:e1001124, 2011.
- (5) Shrawat AK, Carroll RT, DePauw M, Taylor GJ, Good AG. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotech J* 6:722-732, 2008.

¿CÓMO FUNCIONA?

CRISPR/Cas9: La enésima revolución

José Joaquín Serrano

Alumno del Máster en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Málaga
conguino@hotmail.com

207

Al comenzar a escribir este artículo me vienen a la mente conversaciones recientes con algunos buenos amigos; conversaciones que giraban alrededor de si la ciencia avanzaba a saltos o, por el contrario, lo hacía de manera gradual. La respuesta podría ser que siguió un proceso gradual hasta hace algo más de un siglo, momento en el que experimenta un salto espectacular, sobre todo en el campo de la física, con la revolución relativista y cuántica. Además de en el ámbito de la Física, en Biología ya se venía fraguando un cambio con olor a revolución desde mediados del siglo XIX (con la figura notable de Charles Darwin), pero no es hasta los años 70 del siglo pasado cuando tiene lugar el “boom” de la Biología, unos años después de que Watson y Crick propusieran el modelo de doble hélice del DNA. El advenimiento de la tecnología del DNA recombinante propulsó la disciplina biológica hacia la vanguardia en investigación. Desde entonces, una gran cantidad de metodologías, que mejoraban las condiciones para realizar estudios de investigación básica en Biología, han ido apareciendo, permitiendo a los investigadores trabajar, cada vez de manera más frecuente, dentro del contexto “organismo”. Lo que aquí quiero presentar hoy es una de las últimas metodologías en aparecer y revolucionar, con su irrupción, la forma de realizar investigación en Biología. Dividiré en varios puntos el artículo, comenzando con una breve introducción sobre sistemas parecidos que se han venido usando hasta ahora para modificar la expresión génica (el proceso de activación o inactivación de genes y/o sus productos, sean proteínas o RNA de diversos tipos), explicando a continuación en que consiste este sistema y acabando con las aplicaciones del mismo en la investigación más actual, barajando ventajas e inconvenientes.

La investigación biológica ha estado siempre lastrada por las limitaciones de la traslación de los resultados obtenidos *in vitro* (en el laboratorio, bajo condiciones experimentales definidas por el investigador, de forma que se parezcan lo más posible al organismo) hacia el modelo *in vivo* (el propio organismo). En el caso de la expresión génica, la problemática aumenta debido a la gran cantidad de factores que intervienen en la misma. El método para abordar el estudio *in vivo* de la expresión génica de un determinado gen (o genes) se basaba en la realización de los llamados “knockout”, modelos ani-

males (por lo general, ratones) en los cuales se había eliminado o modificado un gen concreto mediante un proceso de recombinación entre la secuencia del gen endógena y una secuencia exógena, complementaria al gen, normalmente presente en un vector de expresión (plásmidos, por ejemplo) (Capecchi, 1989). Sin embargo, este sistema tenía el poderoso inconveniente de que, en muchos casos, mutaba genes que eran indispensables para el desarrollo del animal (también la frecuencia de recombinación es baja en estas tecnologías). La necesidad de mejorar los procesos de modificación génica empujó la búsqueda de alternativas con las que poder controlar los genes que queremos eliminar, o simplemente mutar. El siguiente paso fue la generación de mutantes mediante el sistema Cre-LoxP, una metodología experimental que hace uso de una enzima con actividad recombinasa capaz de reconocer una secuencia de unos 34 pb, los denominados sitios LoxP, catalizando una recombinación intra o intermolecular entre dos sitios de este tipo, escindiendo la secuencia que se encuentra entre ambos, generando una molécula de DNA circular covalentemente cerrada que será degradada. Mediante ingeniería genética se pueden ubicar secuencias LoxP en el sitio del genoma que se quiera eliminar y generar el mutante adecuado. El siguiente paso en la modificación génica vino desde el mundo vegetal, curiosamente, a finales de los 90 del siglo XX y principios del siglo XXI. Estoy hablando del sistema de interferencia por RNA (RNAi, *RNA interference*, del inglés). Este es un sistema basado en el reconocimiento de secuencias de RNA bicatenario que sufren un procesamiento enzimático, generando unos RNA de pequeño tamaño que permiten a un complejo macromolecular, que los utiliza de guía, reconocer secuencias complementarias a ellos y degradarlas, provocando lo que se conoce como silenciamiento de la expresión génica (inactivar el proceso que lleva a que un gen de lugar a un elemento funcional). Este método ha resultado de mucha utilidad para conseguir silenciar familias multigénicas, de forma que se evitan los efectos compensatorios que los distintos miembros de dicha familia tienen sobre la función de un gen de la misma (John et al., 2003).

En la década de los 90 del siglo pasado varios investigadores habían mostrado que el uso de nucleasas para generar roturas dobles en la cadena de DNA podría estimular un pro-

ceso de edición del genoma (modificación de las secuencias de nucleótidos del DNA endógeno) a través de procesos de recombinación mediada por "recombinación homóloga directa", usando un molde que presenta homología al sitio que se quiere modificar (explicado en el párrafo anterior) o, en ausencia de dicho molde, inducir deleciones o inserciones (mutaciones que elimina o introducen, respectivamente, nucleótidos de la secuencia original del gen endógeno) a través de otro mecanismo de reparación de roturas dobles en la hebra de DNA, la "unión de extremos no homólogos" (NHEJ), generándose codones de parada prematuros o cambios en el marco abierto de lectura del gen (Hsu et al., 2014). En los últimos 8 años (aproximadamente) se han generado hasta cuatro metodologías de éste tipo, siendo las que más repercusión han tenido los sistemas ZFN (*zinc finger nucleases*, del inglés, nucleasas dedo de zinc), los TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*, del inglés, nucleasas efectoras con actividad similar a los activadores de la transcripción) y aquella a la que vamos a dedicar más contenido en este artículo, CRISPR/Cas9 (Gaj et al., 2013). Si estas tres metodologías sirven para lo mismo ¿dónde está la diferencia entre ellas? Las dos primeras tecnologías se basan en quimeras proteicas que presentan dominios de unión al DNA y un dominio catalítico de una endonucleasa, mientras que CRISPR/Cas9 es una nucleasa por sí misma, que es guiada por un pequeño RNA (sgRNA, *small guide RNA*) hacia el DNA diana, interaccionando a través de apareamientos de Watson-Crick, apareamientos clásicos entre bases que tienen lugar en los ácidos nucleicos (Ran et al., 2013). Esto ya supone una ventaja, sobre todo a la hora de modificar nuestra diana, ya que con el sistema CRISPR bastaría con introducir un nuevo sgRNA específico para la secuencia de un gen que queramos modificar, mientras que en el caso de los otros dos métodos sería necesario reconstruir el sistema completo de nuevo (Hsu et al., 2014), algo que incrementaría los costes del proceso, probablemente. Así que, sin más dilación, vamos a centrar el resto del artículo en la presentación de la tecnología de edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas9.

CRISPR-Cas es un locus génico formando por un operón, que codifica las proteínas Cas, y una serie de secuencias repetidas idénticas separadas por otras secuencias conocidas como espaciadoras, que son reconocidas por moléculas de DNA intruso (Chylinski et al., 2013). El sistema, presente en bacterias y arqueas, actúa de manera análoga a una inmunidad adaptativa frente a elementos genéticos móviles extraños, ya sean plásmidos (moléculas de DNA circulares con capacidad autorreplicante) o genoma de fagos (virus con capacidad para infectar bacterias). Su descubrimiento tuvo lugar en 1987, pero no fue hasta la segunda mitad de la primera década del siglo XXI cuando se comenzó a dilucidar su funcionamiento (Hsu et al., 2014). Dicho funcionamiento puede dividirse en 3 fases. En una primera fase, conocida como fase de adaptación, una parte del ácido nucleico extraño se incorpora a la zona de

espaciadores del locus, de forma que la infección queda algo así como memorizada para posibles futuros ataques. Esta incorporación, un proceso de transferencia horizontal (transmisión de información genética entre organismos pertenecientes a distintas especies o dominios), está mediado por las propias proteínas Cas, que degradan el DNA extraño, en un primer momento de forma inespecífica, para guiar su incorporación, a posteriori, como nuevos espaciadores en el locus CRISPR-Cas (Gasiunas et al., 2013). En una segunda fase se produce la transcripción de CRISPR-Cas, generándose un precursor denominado CRISPR-RNA o pre-crRNA, que sufre un procesamiento que va a dar lugar a crRNAs de pequeño tamaño que son complementarios a la secuencia de DNA foráneo, de forma que en la tercera fase (conocida como de interferencia) las proteínas Cas, usando como guía a los crRNAs, detectan las secuencias intrusas y las degradan (Chylinski et al., 2013). Se conocen hasta 3 tipos de sistemas CRISPR-Cas, siendo el que tiene más interés, por sus aplicaciones biotecnológicas, el CRISPR-Cas de tipo II. Este sistema tiene una serie de peculiaridades con respecto a los otros dos. La primera diferencia la encontramos en los elementos que llevan a cabo la degradación de los ácidos nucleicos, ya que en los sistemas I y III se trata de un complejo formado por varias proteínas, mientras que en el caso del sistema tipo II solo es necesaria una proteína, Cas. Además de esto, el proceso de maduración del pre-crRNA es diferente entre los tipos I y III y el tipo II. En el caso del tipo II se requiere de la participación de otra molécula de RNA pequeña, no codificante, que presenta complementariedad de bases con el pre-crRNA y que se expresa desde un lugar cercano al locus CRISPR-Cas. Este RNA, denominado tracrRNA, forma dúplex con el pre-crRNA que son reconocidos y cortados por la endoribonucleasa III en presencia de Cas9, que parece ser la única enzima implicada en el corte del DNA diana (Garneau et al., 2010). Los crRNA que se generan sufren otro procesamiento que genera los crRNAs pequeños, en un mecanismo que aún no se comprende bien (Chylinski et al., 2013). Cada uno de estos crRNA va a permanecer unido al correspondiente traCRNA, y el dúplex formado por ambos se asociará con Cas9 (presente solo en bacterias, no en arqueas), formando un complejo ternario que será el encargado de reconocer y eliminar las secuencias de DNA foráneo que sean complementarias a la del crRNA (Sampson & Weiss 2013). El principal requerimiento para que este sistema funcione en bacterias y arqueas es la presencia de una pequeña secuencia (en el caso de *Streptococcus pyogenes* es 5'-NGG-3') conocida como PAM (del inglés, *protospacer adjacent motif*) que se encuentra adyacente al locus CRISPR en dirección 3' y que parece esencial para que las proteínas Cas presenten especificidad por la secuencia de los crRNA (Ran et al., 2013a). Se ha observado que la carencia de dichos PAM dentro de la secuencia de repeticiones directas de CRISPR parece impedir que el propio sistema CRISPR-Cas se ataque a sí mismo (Deveau et al., 2008). Además, los PAM muestran especificidad para cada ortólogo de Cas9 que se conoce (Hsu et al., 2014).

Todo lo comentado en el párrafo anterior ha llevado a varios grupos a plantearse la posibilidad de usar este sistema como método para conseguir una eficiente edición del genoma, permitiendo al investigador adquirir una mayor fiabilidad a la hora de modificar determinados genes. Usando como base el sistema de tipo II, los investigadores han modificado el dúplex crRNA:tracrRNA sintetizando un RNA diana de doble cadena que combina los rasgos de ambos RNAs en un solo RNA, lo que más arriba habíamos denominado sgRNA (Sampson & Weiss, 2013). De esta forma no hace falta ni el procesamiento por la RNAasa III ni la presencia del tracrRNA. Sin embargo, Cas9, al igual que otras nucleasas, posee el inconveniente de cortar en secuencias del genoma que tengan una cierta similitud con la secuencia diana que porta el sgRNA, lo que podría llevar a resultados no deseados. Además, el doble corte en la hebra de DNA que produce Cas9, debido a que posee dos centros con actividad catalítica, va a promover la reparación por NEHJ, con lo que son frecuentes las deleciones e inserciones. Con objeto de minimizar este hándicap, en un primer momento lo que se hizo fue mutar Cas9 para que solo poseyera un sitio catalítico. Esta nueva versión de la enzima se denomina Cas9 D10A e introduce un solo corte en la hebra de DNA. El proceso va a requerir de dos sgRNA, uno para cada cadena del DNA diana, lo que incrementa la especificidad del corte gracias a que existe ahora un mayor número de bases que necesitan ser reconocidas de manera específica; además, los nuevos cortes serán reparados por otro sistema molecular que presenta una alta fiabilidad, la reparación por escisión de bases (Ran et al., 2013a, 2013b). Para poder facilitar un doble corte eficiente con este sistema, los sgRNAs deben de sintetizarse de forma que al producirse se originen extremos salientes en 5' (que sobresalen de la cadena de DNA). Los sitios de corte de la enzimas Cas9 deben de estar separados al menos 20 pares de bases para que se generen dichos extremos salientes (Ran et al., 2013a). Además de poder editar el genoma, este sistema permite también ejercer un control sobre la propia expresión génica, sin llevar a cabo una alteración permanente del genoma celular. Esto se puede conseguir inactivando los dos dominios proteicos con actividad nucleasa que posee Cas9 (en esta forma la enzima se denomina dCas9), de manera que cuando el sgRNA guía a Cas9 hacia la secuencia diana específica, en lugar de procesar el segmento génico correspondiente lo que hace es unirse al mismo y bloquear la unión de la RNA polimerasa, de forma que no se puede producir la elongación de la transcripción (Sampson & Weiss, 2013). Esta forma sin actividad nucleasa puede aprovecharse de igual modo para justamente el proceso contrario, activar la transcripción mediante la fusión de la dCas9 a un activador transcripcional (Sampson & Weiss, 2013).

Las aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 que se están desarrollando son muchas en muy poco tiempo y su número no deja de crecer. El desarrollo de esta tecnología está permitiendo, por ejemplo, que se puedan manipular genéticamente

especies que hasta ahora habían sido esquivas a las técnicas de manipulación genética más al uso (esto podría aumentar el rango de organismos modelo). Supone un avance, además, en tanto en cuanto es viable pensar que podría permitir la modificación o generación de líneas celulares determinadas, además de la generación de nuevos mutantes in vivo. Entre las aplicaciones más prometedoras se encuentra la de poder recapitular las mutaciones genéticas encontradas en grupos de pacientes afectados por una enfermedad, para de esta forma poder determinar con mayor seguridad la causa de las mismas (Hsu et al., 2014). La posibilidad que ofrece esta tecnología de inactivar ambos alelos en un mismo gen abre una nueva vía en la investigación de enfermedades genéticas: usando Cas9 se puede estudiar, por ejemplo, el efecto de una variante génica en una enfermedad que muestra una fuerte asociación con haplotipos identificados por estudios de asociación genómica a gran escala en humanos (Wang et al., 2014). También puede utilizarse para modificar varios genes de manera individual (Wang et al., 2013) o para estudiar el efecto que tiene la edición de dichos genes sobre un determinado tipo celular (Hsu et al., 2014). Entre las enfermedades donde esta nueva metodología permitiría obtener mejores resultados se encuentra el cáncer. Ya se están realizando ensayos donde se observa cómo utilizando este sistema se puede fenocopiar (copiar el fenotipo) el desarrollo de tumores en ratones, así como comprobar el efecto sinérgico de dos mutaciones claves en la formación de un cáncer hepático, también en ratones (Xue et al., 2014). Dado que Cas9 solo requiere del PAM para que su funcionamiento sea óptimo, se pueden realizar construcciones in vitro de plásmidos con casetes que incluyan varios sgRNA que reconozcan diferentes secuencias en el genoma, con lo que se puede modificar, al mismo tiempo, varios genes que previamente habían mostrado una fuerte correlación con algún fenotipo propio de alguna enfermedad (Sakuma et al., 2014; Hsu et al., 2014). Del mismo modo que se pueden dirigir sgRNAs para editar secuencias génicas, se puede usar esta nueva tecnología para la edición de secuencias reguladoras o no-codificantes (Hsu et al., 2014), con vistas a poder descubrir nuevas secuencias de este tipo o aclarar la función de alguna de ellas. Aprovechando la capacidad que describimos antes para unir Cas9 a reguladores de la transcripción, podría fusionarse a modificadores del estado epigenético y de esta forma avanzar en el conocimiento de cómo influye la metilación o los estados de la cromatina en el desarrollo de determinadas enfermedades (Hsu et al., 2014).

A pesar de las numerosas ventajas que este sistema ofrece, aún se encuentra en período de prueba. Ya hemos visto que Cas9 presenta una cierta variabilidad en el corte, lo que provoca que, en sus primeros intentos por hacer uso de esta tecnología, los investigadores observaran la existencia de una relativa diversidad de secuencias modificadas -secuencias con cierta similitud con la secuencia del sgRNA o del crRNA usado para guiar a Cas9. También queda por establecer cómo afecta

la accesibilidad a la cromatina a este sistema, aunque ya se ha observado que dCas9 se une con relativa eficacia a la cromatina inaccesible (Perez-Pinera et al., 2013). Para el final he dejado el que, a priori, supone el principal problema: la eficacia del propio sistema CRISPR-Cas9. Como con otros métodos de transgénesis, lo más utilizado hasta ahora era el uso de vectores virales para la transfección (introducir genes de interés, que no tienen que ser del organismo con el que se trabaja, en dicho organismo). Sin embargo, la eficacia en la transformación es relativamente baja (3% señalan Xue et al. en su artículo), con lo cual es necesaria una mejora en dicho aspecto. Recientemente se ha llevado a cabo una investigación en la que han conseguido introducir (sin modificar) Cas9 unido al sgRNA, aumentando la eficacia de modificación hasta en un 80% y aumentando la especificidad de dicha modificación hasta 10 veces si se compara con la transfección por plásmidos (Zuris et al., 2014). Esto lo llevan a cabo aprovechando la

constelación de cargas que poseen ambas moléculas, tanto de Cas9 como del sgRNA. Los mismos autores habían probado con anterioridad tecnologías para la introducción de ácidos nucleicos basada en la conjugación o fusión con moléculas catiónicas (como péptidos sin estructura o proteínas con muchas cargas positivas) que facilitan la endocitosis (Cronican et al., 2010; Thompson et al., 2012). Pero eso ya es otra historia...

Cabe decir, por último, que durante la elaboración de esta introducción al sistema CRISPR/Cas9, la cantidad de bibliografía ha ido aumentando, con lo que puede que haya más información al respecto de la que aquí se cubre. Sin embargo, la idea principal de cómo funciona el sistema creo que queda suficientemente cubierta.

Bibliografía citada:

- * Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288–1292.
- * Chylinski, K., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5), 726-737.
- * Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823
- * Cronican, J. J., Thompson, D. B., Beier, K. T., McNaughton, B. R., Cepko, C. L., & Liu, D. R. (2010). Potent delivery of functional proteins into Mammalian cells in vitro and in vivo using a supercharged protein. *ACS Chemical Biology*, 5(8), 747-752.
- * Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., and Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 190, 1390–1400
- * Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397-405.
- * Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadañ, A.H., and Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67–71.
- * Gasiunas, G., Sinkunas, T., & Siksnys, V. (2014). Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 449-465.
- * Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- * John, M., Geick, A., Hadwiger, P., Vornlocher, H. P., & Heidenreich, O. (2003). Gene silencing by RNAi in mammalian cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, 26-2.
- * Li, W., Teng, F., Li, T., & Zhou, Q. (2013). Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(8), 684-686
- * Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Adler, A.F., Kabadi, A.M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., Ousterout, D.G., Leong, K.W., et al. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods* 10, 973–976.
- * Ran, F., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E. & Zhang, F. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- * Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
- * Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4, 5400.
- * Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2014). Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays*, 36(1), 34-38.
- * Thompson, D. B., Villaseñor, R., Dorr, B. M., Zerial, M., & Liu, D. R. (2012). Cellular uptake mechanisms and endosomal trafficking of supercharged proteins. *Chemistry & Biology*, 19(7), 831-843.
- * Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910-918.
- * Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., & Lander, E. S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 343(6166), 80-84.
- * Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N. S., & Jacks, T. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 514, 380-396.
- * Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., & Liu, D. R. (2014). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, 33, 73-80

Procesos osmorreguladores en peces teleósteos: control mediado por diferentes sistemas endocrinos

Juan Antonio Martos-Sitcha*, Laura Cádiz, Arleta Krystyna Skrzynska#, Gonzalo Martínez-Rodríguez†, Juan Miguel Mancera‡

*Dr. en Programa Oficial de Posgrado en Medio Marino: Ciencia y Desarrollo Sostenible, Universidad de Cádiz, Alumna de Tercer Ciclo del Programa de Doctorado en "Recursos Marinos", Universidad de Cádiz, # Becaria predoctoral, Universidad de Cádiz, ‡ Investigador Científico, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC), † Catedrático de Universidad, Área de Zoología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz juanantonio.sitcha@uca.es

1. Introducción a los procesos osmorreguladores en peces teleósteos

Un gran número de especies de peces se definen como eurihalinas, siendo capaces de soportar cambios drásticos en la salinidad ambiental. Dentro de estas especies se pueden distinguir entre: i) teleósteos totalmente eurihalinos, si son capaces de habitar desde medios de agua dulce hasta medios con alta salinidad; y ii) teleósteos parcialmente eurihalinos, cuando el rango de salinidades en el que pueden vivir excluye los medios de agua completamente dulce. Por su parte, otra de las formas en las que los peces teleósteos pueden diferenciarse dependerá del ambiente en el que habiten; esto es, peces de agua dulce o peces de agua salada. Dependiendo del ambiente externo en el que se encuentren los animales, las estrategias osmorreguladoras van a ser diferentes para garantizar la correcta supervivencia de los organismos. Así, y asumiendo que el punto de balance iónico entre el medio interno del animal y el medio ambiente (punto isoosmótico) es de 12 ppt de salinidad, los principales problemas a los que los ejemplares de agua dulce se van a enfrentar van a ser: i) una salida pasiva de iones desde el medio interno, principalmente por las branquias, y ii) una ganancia pasiva de agua; todo ello será compensado por i) una captación activa de iones desde el medio, y ii) la producción de una orina muy diluida que permita la eliminación hídrica en exceso (Figura 1). Por su parte, los peces de agua marina, cuyo medio interno está mucho más diluido en sales que el medio ambiente (35-38 ppt de salinidad), se van a enfrentar a los siguientes problemas: i) una entrada de iones desde el medio de forma pasiva a favor de gradiente, y ii) una deshidratación por pérdida pasiva de agua, entrando en juego por tanto una serie de mecanismos encaminados a la secreción de iones desde el medio interno a través de diversas estructuras (branquia, opérculo, in-

testino,...), la producción de una orina muy concentrada en sales que evite además una gran pérdida hídrica, y la ingestión de agua salada (Figura 1). Esta capacidad de eurihalinidad requiere la existencia de una regulación iónica y osmótica que ayude a mantener las condiciones osmóticas de su medio interno dentro de unos límites determinados, para lo cual es necesario un aporte extra de energía.

Por su parte, los desbalances entre el medio interno y el medio externo producen la activación del sistema de estrés y metabólico, en donde la actuación de diversas hormonas permiten la correcta función de los órganos involucrados y la propia supervivencia de los organismos. La exposición a diferentes salinidades ambientales precisa de la regulación de las citadas estrategias osmorreguladoras por parte del sistema endocrino, con el objeto de mantener un correcto balance hídrico y electrolítico en el ejemplar.

2. Sistema endocrino

El sistema osmorregulador de peces teleósteos está controlado por el sistema endocrino a través de una amplia diversidad de hormonas, tanto hipofisarias (prolactina, hormona del crecimiento, etc.) como extrahipofisarias (arginina vasotocina, urotensinas, estañocalcina, etc.). El conjunto de procesos controlados por el sistema endocrino no es un sistema aislado, sino que abarca diversos sistemas que interactúan entre sí y que incluyen una gran variedad de tejidos. De esta forma, la adaptación de los peces frente a cambios en la salinidad ambiental produce la activación de los diversos factores que intervienen en los procesos de secreción y/o absorción de iones y agua, así como su control por parte de diversas hormonas a través de sus receptores específicos, desencadenando las rutas celulares necesarias para integrar la acción fisiológica contenida en ellas (Figura 2).

Dentro de las glándulas endocrinas, la hipófisis se considera una "glándula maestra", al con-

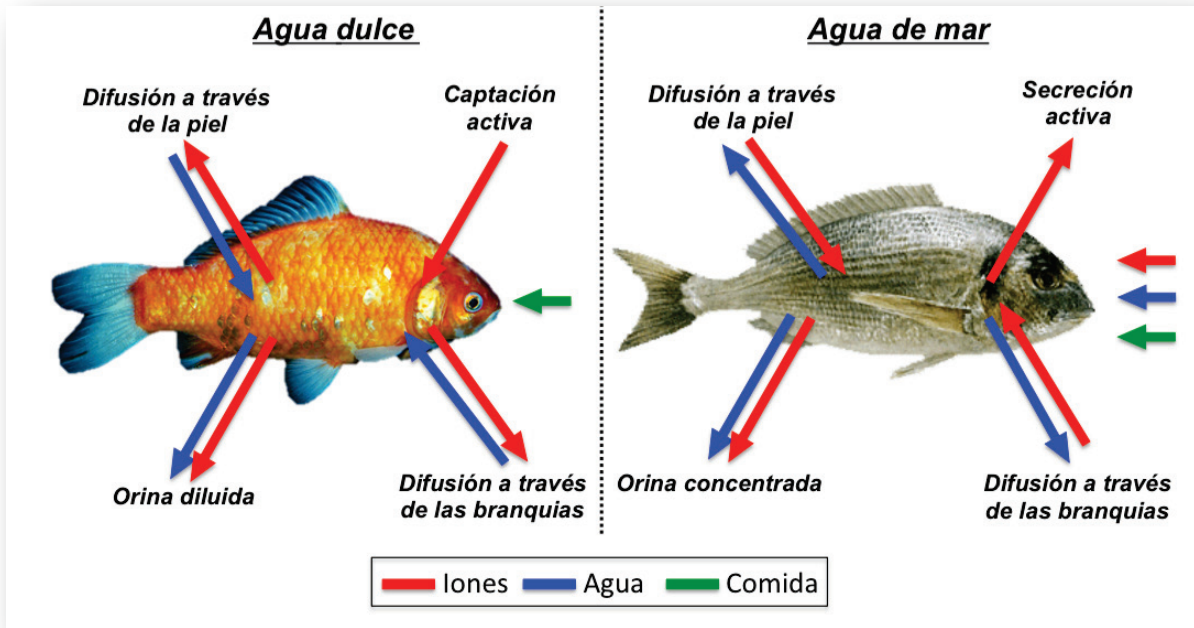


Figura 1: Esquema general de los principales problemas y estrategias llevadas a cabo por teleosteos osmorreguladores para mantener el equilibrio hídrico e iónico frente a diferentes salinidades ambientales. (Imagen creada por los autores del trabajo).

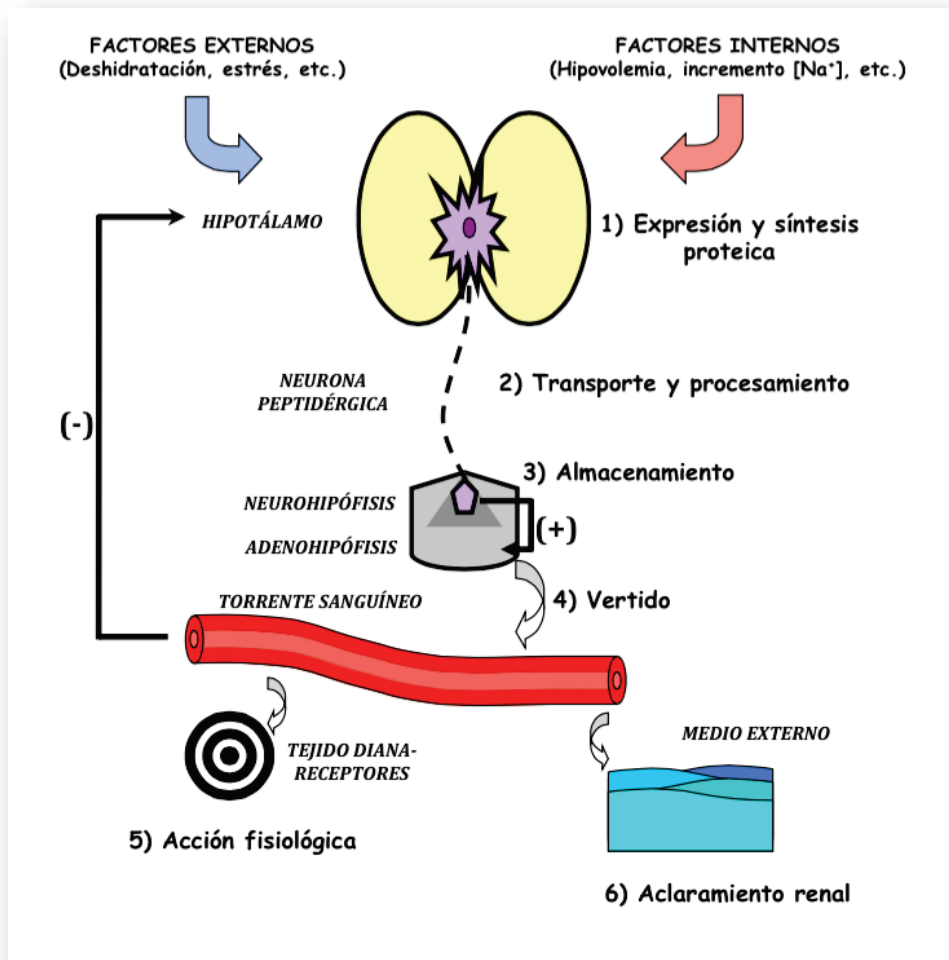


Figura 2: Esquema general propuesto para las rutas implicadas en la síntesis, liberación y acción de hormonas neurohipofisarias. (Imagen creada por los autores del trabajo).

trolar, por medio de las hormonas que secreta a la circulación, una amplia diversidad de procesos fisiológicos. Esta glándula está formada por dos tejidos de origen embriológico muy diferente: i) la neurohipófisis, derivada del tejido nervioso, y cuyas hormonas son sintetizadas en neuronas hipotalámicas; y ii) la adenohipófisis, derivada del endodermo primordial [1]. La neurohipófisis se encuentra conectada al hipotálamo a través del tallo del infundíbulo, por donde se transportan los neuropéptidos desde distintos núcleos hipotalámicos, como el supraóptico (NSO) y el paraventricular (NPV), y que son liberados a nivel de la glándula neurohipofisaria. Algunos de estos neuropéptidos pueden ser secretados al espacio sináptico funcionando como neurotransmisores clásicos. Sin embargo, otros pueden ser liberados al torrente sanguíneo, principalmente a nivel de la neurohipófisis, presentando una acción hormonal típica constituyendo el clásico ejemplo de neurosecreción.

Por su parte, existen otros tejidos muy importantes por su función como productores de hormonas involucradas en el proceso osmorregulador, como es el caso del cortisol producido en el riñón cefálico, cuya función ha sido descrita en la adaptación a ambientes hiperosmóticos, la estaniocalcina producida en los corpúsculos de Stannius para la regulación del Ca^{2+} , o los péptidos natriuréticos atriales sintetizados en el corazón y encargados de la regulación de la vasoconstricción o vasodilatación del sistema circulatorio.

Existen diversos estudios que han tratado de esclarecer la endocrinología del proceso osmorregulador, siendo los sistemas vasotocinérgico y/o isotocinérgico (homólogos a los sistemas vasopresinérgico y oxitocinérgico de mamíferos) parte de la compleja cascada regulatoria que se produce. En este trabajo, se realizará una aproximación al estudio de estos sistemas endocrinos por parte de sus hormonas neurohipofisarias (arginina vasotocina –AVT, e isotocina –IT, respectivamente) en el control de dichos procesos.

3. Arginina vasotocina e isotocina: función del sistema endocrino a nivel osmorregulador

Diversos estudios han demostrado la existencia de una interacción entre los sistemas vasotocinérgico e isotocinérgico y diferentes fuentes de estrés en peces teleósteos, en donde el estrés osmótico constituye uno de los principales mecanismos de activación de dichos sistemas endocrinos.

Estudios previos sobre cambios metabólicos y osmorreguladores en ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) tratadas con AVT muestran que los niveles de actividad Na^+, K^+ -ATPasa (NKA), enzima clave para el transporte de Na^+ y K^+ entre el medio extracelular y el citoplasma, aumentan en ejemplares de agua de mar (38 ppt de salinidad) [2]. Esto podría ser interpretado como un efecto de la AVT sobre receptores específicos de la hormona en las células de cloro encargadas de realizar los procesos de activación de la secreción de Na^+ desde el medio interno, además de servir como fuerza motriz para el intercambio de otros iones como el Cl^- . Así, la AVT ha sido tradicionalmente descrita como la hormona antidiurética, y recientemente por estar controlando a través de sus receptores específicos tanto el proceso de intercambio iónico (a través de la NKA o el *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* –CFTR) como de agua (por medio de la acción de diferentes aquaporinas) [3]. Sin embargo, la acción de la IT como modulador del sistema osmorregulador permanece aun sin esclarecer [3, 4].

Por su parte, otras hormonas como el cortisol han sido descritas como piezas clave en los procesos de adaptación a ambientes hipersalinos por su cooperación en el control de diversos transportadores iónicos como la NKA, al igual que para el caso de la prolactina (PRL) en la adaptación de ambientes hiposalinos, por lo que el sistema osmorregulador en sí debe de ser considerado como un conjunto de rutas que podrían estar controlándose conjuntamente mediante la participación de diversos sistemas endocrinos.

Además, todos estos procesos osmorreguladores necesitan de la existencia de diversos órganos en donde se encuentren los transportadores iónicos e hídricos encargados del mantenimiento de un balance interno constante, los cuales sirven como tejido diana al presentar los receptores específicos que son capaces de integrar la información de las hormonas involucradas. Dentro de ellos, las branquias y el opérculo, el tracto gastrointestinal y el riñón, pueden ser considerados como los más importantes por haberse observado tanto la presencia de dichos receptores como diversos efectos encaminados al equilibrio osmótico.

Así, los primeros estudios en señalar las branquias como órgano diana para la AVT aparece en los años sesenta del siglo pasado, en donde la inyección de esta hormona facilita la salida de sodio en ejemplares de *Platichthys flesus* transferidos de agua dulce a agua de mar [5]. Por su parte, en *Carassius auratus*, especie estenohalina de agua dulce, se ha demostrado que

la administración de IT, y en menor medida de AVT, incrementa la captación de sodio a través de las branquias [6]. Del mismo modo, la primera evidencia de la existencia de receptores en este tejido se obtuvo por medio del marcado de AVT con ^{125}I en células branquiales aisladas en ejemplares de *Anguilla anguilla* adaptados a agua dulce y a agua de mar [7], aunque estudios recientes de expresión del ARNm de los receptores de AVT e IT en una amplia distribución de tejidos en *S. aurata* confirma este tejido (así como el opérculo) como diana de ambas hormonas [3]. Además, en el estudio de Marshall [8] con el teleosteo estuarino *Fundulus heteroclitus*, se sugiere que la regulación de la secreción de NaCl en agua de mar está mediada por receptores de AVT presentes en la membrana basolateral de las células de cloruro. Igualmente, otros estudios han demostrado como la acción osmoreguladora de estas hormonas se basan en la acción vasoconstrictora de las arterias aferentes branquiales [9].

Por su parte, en el riñón de muchos peces teleosteos, y a diferencia de lo que sucede en mamíferos, el balance glomérulo-tubular parece tener un escaso desarrollo o ser casi inexistente,

y la tasa de filtración glomerular aumenta por un incremento en la presión de perfusión renal [10]. Así, la inducción de hipertensión por la AVT e IT podría ser responsable del incremento de la tasa de filtración glomerular, y de esta forma afectar al balance de agua/iones. Además, Amer y Brown [11] demostraron que la administración de dosis bajas de AVT (10^{-11} M) producían un incremento en la reabsorción tubular de agua y una disminución de este proceso tras la adición de mayores concentraciones (10^{-9} M) de la hormona, por lo que los efectos fisiológicos parecen ser dosis-dependientes.

Por último, entre las funciones del tracto gastrointestinal está presente la capacidad osmoreguladora. Sin embargo, hasta el momento existen pocos datos sobre el efecto osmorregulador de las hormonas neurohipofisarias a nivel intestinal. Aun así, se ha descrito la presencia de receptores de AVT e IT en el intestino, así como la regulación por parte de éstos receptores sobre diversos transportadores iónicos en *S. aurata* [12].

Bibliografía citada:

- [1] Bentley PJ. Comparative Vertebrates Endocrinology. 3rd Edition. Cambridge University Press. Cambridge , 67-176, 1998.
- [2] Sangiao-Alvarellos S, Polakof S, Arjona FJ, Kleszczynska A, Martin del Rio MP, Miguez JM, Soengas JL y Mancera JM. Osmoregulatory and metabolic changes in the gilthead sea bream *Sparus auratus* after arginine vasotocin (AVT) treatment. *General and Comparative Endocrinology* 148: 348-58, 2006.
- [3] Martos-Sitcha JA, Fuentes J, Mancera JM y Martínez-Rodríguez G. Vasotocin and isotocin receptors in gilthead sea bream *Sparus aurata*: expression variations during different osmotic challenges. *General and Comparative Endocrinology* 197: 5-17, 2014.
- [4] Martos-Sitcha JA, Wunderink YS, Gozdowska M, Kulczykowska E, Mancera JM y Martínez-Rodríguez G. Vasotocinergic and isotocinergic systems in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): an osmoregulatory story. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166: 571-581, 2013a.
- [5] Motais R y Maetz J. Effect of Neurohypophysis Hormones on Sodium Metabolism (Measured by Radiosodium Na^{24}) in a Euryhaline Teleost, *Platichthys Flesus* L. *General and Comparative Endocrinology* 77: 210-24, 1964.
- [6] Maetz J, Bourguet J, Lahlou B y Hourdry J. Peptides neurohypophysaires et osmoregulation chez *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 4: 508-522, 1964.
- [7] Guibbolini ME, Henderson IW, Mosley W y Lahlou B. Arginine vasotocin binding to isolated branchial cells of the eel: Effect of salinity. *Journal of Molecular Endocrinology* 1: 125-130, 1988.
- [8] Marshall WS. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: Coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1618: 95-105, 2003.
- [9] Conklin DJ, Mick NW y Olson KR. Arginine vasotocin relaxation of gar (*Lepisosteus* spp.) hepatic vein in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 104: 52-60, 1996.
- [10] Nishimura H y Bailey JR. Intrarenal renin-angiotensin system in primitive vertebrates. *Kidney international. Supplement* 12: S185-92, 1982.
- [11] Amer S y Brown JA. Glomerular actions of arginine vasotocin in the in situ perfused trout kidney. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 269, 1995.
- [12] Martos-Sitcha JA, Gregório SF, Carvalho ESM, Canario AVM, Power DM, Mancera JM, Martínez-Rodríguez G y Fuentes J. AVT is involved in the regulation of ion transport in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* 193: 221-228, 2013b.

VIDA Y OBRA

Humboldt, Alexander von. Tegel (Alemania), 14.IX.1769 – Berlín (Alemania), 6.V.1859. Naturalista, geógrafo y explorador.



Reproducimos aquí, con el permiso de su autor, la biografía de Alexander von Humboldt publicada en el *Diccionario Biográfico Español* de la *Real Academia de la Historia*.

Alexander von Humboldt nació en el denominado por él como “castillo del aburrimiento” en Tegel, muy cerca de Berlín, un mediano palacete en el que discurrió su infancia, siempre acompañado por su hermano mayor Wilhelm. Su padre fue un importante personaje palaciego, chambelán del rey de Prusia, y su madre, Elisabeth Colomb, una mujer rica que parece que marcó profundamente la personalidad de Alexander. La influencia de Joachim Heinrich Campe, un educador al que la bibliografía humboldtiana no trata demasiado bien, parece evidente. Su afición a la literatura de viajes y el haber sido él mismo un escritor de más o menos éxito con la publicación de su particular *Robinson*, tuvo que influir necesariamente en la imaginación del joven Alexander. Sabemos hoy también que Campe fue un destacado miembro de la masonería alemana y está claro que Humboldt adquirió bastantes principios ideológicos de esta asociación. Asimismo tuvo como segundo profesor a Gottlob C. Kunth, quien parece que dejó su impronta en la adquisición de algunos valores éticos, en la enseñanza de

la filosofía roussoniana y en el aprendizaje de otros idiomas. Este elemento se considera

muy relevante en el éxito de ambos hermanos en los círculos culturales de la época, incluidos los judíos berlineses que al parecer influyeron de manera importante en la educación de Alexander, con especial importancia la tertulia de Marcus Herz y su esposa Henriette, un espacio cultural privilegiado en el Berlín ilustrado.

El propio Alejandro de Humboldt dejó trazada su peripecia

en el Archivo Histórico Nacional en Madrid, y que seguiremos con bastante fidelidad.

Después de haber disfrutado de una educación muy cuidada en la casa paterna y de la enseñanza de los sabios más distinguidos de Berlín, acabó sus estudios en la Universidades de Gotinga y Frankfurt. Destinado entonces a la carrera de hacienda estuvo durante un año en la Academia de comercio de Hamburgo, establecimiento dedicado tanto a la instrucción de negociantes, como a la de las personas, que debían servir al Estado en la dirección del Comercio, de los bancos y de las manufacturas. El éxito que tuvo su primera obra sobre las montañas basálticas del Rin, hizo que el Barón de Heinitz le contratase para su departamento en la dirección de Minas. Efectuó por entonces un viaje de mineralogía y de historia natural por Holanda, Inglaterra y Francia bajo la dirección de George Forster, célebre naturalista, que había dado la vuelta al mundo con el Capitán Cook. Según Humboldt, a él le debía la mayor parte de los conocimientos que poseía antes de su viaje americano. A la vuelta de Inglaterra

aprendió la práctica de la minería en Freiberg y en Harz. Tras algunas experiencias útiles para el ahorro de combustible en el cocimiento de sal y después de haber publicado una pequeña obra relativa a este asunto, el rey le envió a Polo-



Alexander von Humboldt (Friedrich Georg Weitsch, 1806), quizás el más conocido retrato idealizado de Humboldt como naturalista

vital en los siguientes años en la biografía que presentó en 1799 al ministro español Mariano Luis de Urquijo en el escrito “Noticia sobre la vida literaria de Mr. de Humboldt (sic), comunicada por él mismo al Barón de Forell”, que se conserva





216

nia y al sur de Alemania para estudiar las minas de sal gema de Vieletzca, Hallein, Berchtesgaden... Los planes, que puso en marcha sirvieron para los nuevos establecimientos de las Salinas de Magdeburg. Además, tras la incorporación a la Corona de Prusia de los Margraviatos de Franconia, el rey le nombró director de minas de estas provincias, en las que la explotación estaba descuidada desde hacía siglos. Estuvo consagrado a la práctica de la minería durante tres años, en los que las minas de alumbre, de cobalto, e incluso las de oro de Golderonach comenzaron a ser rentables para las arcas del rey. Poco después se le envió por segunda vez a Polonia, para dar noticias sobre el provecho, que se podría sacar de las montañas de esta nueva provincia. Dirigió a la vez los proyectos para la mejora de las fuentes salinas situadas a orillas del Báltico. Fue durante esta estancia continuada en las minas, cuando hizo una serie de experiencias, bastante peligrosas, sobre los medios de volver menos nocivas las mofetas subterráneas, y salvar a las personas asfixiadas. Consiguió construir una nueva lámpara antimefítica, que no se apagaba con ningún gas, y la máquina de respiración; instrumentos que servían al mismo tiempo a los minadores militares, cuando el contraminador impedía sus trabajos con humo. Este aparato tuvo la aprobación del Consejo de guerra y su simplicidad le hizo extenderse rápidamente por otros países. Publicó también durante este período una obra de Botánica, *Flora Fribergensis*, la Fisiología química de los vegetales, traducida a numerosas lenguas, y un gran número de memorias de física y de química, contenidas en parte en los periódicos de Francia e Inglaterra.

A la vuelta de Polonia acompañó a Hardenberg en sus negociaciones políticas, que el rey le había encargado poco antes de la paz de Basilea. Le siguió en su visita a los ejércitos, acantonados junto al Rin, en Holanda, y en Suiza. Fue allí, cuando tuvo la oportunidad de visitar la alta cadena de los Al-

pes, el Tirol, la Saboya y el resto de la Lombardía. Cuando al año siguiente las tropas francesas avanzaron hacia la Franconia, fue enviado al cuartel general de Moreau para negociar sobre la neutralidad de algunos príncipes del Imperio, cuya protección había asumido el rey prusiano.

Según sus propias palabras:

«Teniendo un ardiente deseo de ver otra parte del mundo y de verla con la referencia de la física general, de estudiar no solamente las especies y sus caracteres, estudio que se ha hecho casi exclusivamente hasta hoy día, sino la influencia de la Atmósfera y de su composición química sobre los cuerpos organizados; la formación del globo, las identidades de las capas (estratos) en los países más alejados unos de otros, en fin las grandes armonías de la Naturaleza, tuve el deseo de dejar por algunos años el servicio del Rey y de sacrificar una parte de pequeña fortuna al progreso de las Ciencias. Solicité mi licencia, pero S. M. en lugar de concedérmela, me nombró su Consejero Superior de Minas, aumentando mi pensión y permitiéndome hacer un viaje de historia natural. No pudiendo ser útil a mi patria en una ausencia tan grande, no acepté la pensión, dando las gracias a S. M. por una gracia, menos acorde a mi poco mérito, que al de un padre, que gozó hasta su muerte de la confianza más distinguida de su Soberano.»

Para preparar su viaje reunió una escogida colección de instrumentos científicos, para poder determinar la posición astronómica de los lugares, la fuerza magnética, la declinación y la inclinación de la aguja imantada, la composición química del aire, su elasticidad, humedad y temperatura, su carga eléctrica, su transparencia, el color del cielo, la temperatura del mar, etc.

Humboldt, en su autobiografía, describió sus últimas experiencias antes del viaje americano con las siguientes palabras:

«Habiendo hecho por entonces algunos descubrimientos sorprendentes sobre el fluido nervioso y la manera de estimular los nervios por agentes químicos, aumentando y disminuyendo la irritabilidad a vo-

luntad, sentí la necesidad de hacer un estudio más singular de Anatomía. Con este objeto estuve cuatro meses en la Universidad de Jena y publiqué los 2 volúmenes de mis Experiencias sobre los Nervios y el proceso químico de la vitalidad, obra cuya traducción ha aparecido en Francia. Me trasladé de Jena a Dresde y Viena para estudiar las riquezas botánicas y para entrar nuevamente en Italia. Los sucesos de Roma me hicieron desistir de este proyecto y encontré durante mi estancia en Salzburgo un nuevo método para analizar el aire atmosférico, método sobre el cual he publicado una memoria con Vauquelin. Al mismo tiempo acabé la construcción de mi nuevo Barómetro y de un instrumento, que he llamado Antracómetro, porque mide la cantidad de ácido carbónico contenido en la atmósfera. Con la esperanza de poder llegar hasta Nápoles, partí hacia Francia, donde trabajé con los químicos de París durante 5 meses. Leí numerosas Memorias en el Institut National, contenidas en los Annales de Chimie, y publiqué dos obras, una sobre las mofetas de las minas y los medios de volverlas menos dañinas, la otra sobre el análisis del aire.»

El Directorio Francés decidió por aquella época hacer un viaje alrededor del mundo con tres buques bajo el mando del Capitán Baudin, al que Humboldt fue invitado por el ministro de Marina. Se preparaba ya para partir hacia el Havre, cuando la falta de fondos hizo fracasar este proyecto. Decidió entonces irse a África para estudiar el Monte Atlas; aguardó durante dos meses a su embarcación en Marsella, pero los cambios políticos ocurridos en Argel, le hicieron renunciar a este proyecto y tomar el camino de la península a fin de solicitar la protección de S. M. Católica para un viaje a América.

Sobre su audiencia en la Corte española, gestionada por el barón de Forell, embajador de Sajonia, el gran colaborador de Clavijo y de Herrgen en el Real Gabinete de



Historia Natural y en el nuevo Real Estudio de Mineralogía, ha quedado el testimonio que él mismo recuerda en su Viaje a las Regiones Equinocciales del Nuevo Continente:

«Fui presentado a la corte de Aranjuez, en el mes de marzo de 1799. El rey se dignó acogerme con bondad. Le expuse los motivos que me inducían a emprender un viaje al nuevo continente y a las islas Filipinas, y presenté una memoria sobre esta materia al secretario de Estado. El caballero de Urquijo apoyó mi solicitud y logró allanar todos los obstáculos. El proceder de este Ministro fue tanto más generoso cuanto no tenía yo nexos ninguno personal con él. El celo que mostró constantemente para la ejecución de mis proyectos no tenía otro motivo que su amor por las ciencias. Es un deber y una satisfacción para mí consignar en esta obra el recuerdo de los servicios que me prestó.»

Hay una carta del barón de Forell, fechada en Aranjuez el 11 de marzo de 1799, y dirigida a Mariano Luis de Urquijo, en la que el embajador de Sajonia presentaba el proyecto de Humboldt, convencido de que el permiso para visitar los dominios españoles en América daría como fruto un gran avance en los conocimientos científicos del mundo natural. Forell solicitaba la protección de Urquijo, que ya había dado pruebas de su interés en el progreso de las ciencias, tanto para Alejandro de Humboldt como para Aimé Bonpland, sólo mencionado, sin su nombre, como secretario y copista. Asimismo, el embajador pedía que se entregase la memoria al rey Carlos IV y en caso de aprobación, solicitaba la expedición de los pasaportes y de cartas de recomendación necesarias para que el sabio prusiano pudiera pasar a América con los instrumentos adecuados para sus observaciones. Además, Alejandro de Humboldt presentó una Memoria al rey Carlos IV, en la que manifestaba sus intereses científicos. Resulta extremadamente interesante que Humboldt solicitase el permiso para penetrar en

el Nuevo Mundo, alegando la perfección de los nuevos instrumentos de medición de los fenómenos atmosféricos, pero sobre todo haciendo hincapié en su particular obsesión, repetida en numerosas cartas a sus amigos, la formación del Globo, la medida de las capas que lo componen y el reconocimiento de las relaciones generales que unen a los seres organizados; objetivos que contrastan con lo señalado en el pasaporte y el permiso especial de Urquijo, que destacaban el estudio de las minas, una empresa más práctica para los gobernantes españoles.

Respecto a la financiación de su viaje, el propio Humboldt aclaró unos años más tarde al Journal de Bordeaux, que lo había hecho a sus expensas, aunque con la protección magnánima del rey de España durante los cinco años que había durado el viaje, algo que sin duda implicaba el ahorro de determinados gastos pero no la necesidad de disponer de un presupuesto propio. Sabemos que desde Barcelona había solicitado a Kunth dinero para instalarse en Madrid y el 4 de abril de 1799, ya en Madrid, le comentaba que el marqués de Irlanda, miembro del Consejo Real de Hacienda y uno de los hombres más distinguidos de Europa, le trataba como un padre y le facilitaría todo lo necesario para su viaje.

Para conocer el viaje americano de Humboldt y Bonpland, la mejor fuente es el escrito que él mismo escribió y se conserva en la *American Philosophical Society* en Filadelfia. Según el propio Humboldt, los dos viajeros zarparon de La Coruña con la fragata española "Pizarro" rumbo a las islas Canarias, donde ascendieron al cráter del Pico del Teide y realizaron experimentos para el análisis del aire. En julio llegaron al puerto de Cumaná en América meridional. Visitaron en 1799 y en 1800 la costa de Parí, las misiones de los indios chaymas, las provincias de Nueva Andalucía (afectada por terribles terremotos, uno de los países más calurosos y más saludables de la tierra), de Nueva Barcelona, de Venezuela y de la Guayana española. En enero de 1800 salieron de Caracas en dirección a los bellos

valles de Aragua, donde el gran lago de Valencia recuerda al de Ginebra, adornado por la majestuosa vegetación tropical.

Desde Portocabello atravesaron al sur las inmensas planicies de Calabozo, del Apure y del Orinoco, los Llanos, donde en la sombra (debido a la reverberación del calor) el termómetro de Réaumur subía a 35-37 grados.

En San Fernando de Apure, en la provincia de Barinas, Humboldt y Bonpland comenzaron esta fatigosa navegación y levantaron el mapa del país con la ayuda de relojes de longitud, de los satélites de Júpiter y de las distancias lunares. Descendieron el río Apure que desemboca bajo los 7° de latitud en el Orinoco, remontaron este último río (pasando los célebres raudales de Maipures y Atures) hasta la boca del Guaviare. Desde esta embocadura subieron por los pequeños ríos Atabapo, Tuamini y Temí, y de la misión de Yavitá cruzaron por tierra a las fuentes del famoso río Negro, que bajaron hasta San Carlos. Desde la fortaleza de San Carlos del Río Negro, Humboldt remontó hacia el Norte por el río Negro y el Casiquiare al Orinoco y encima de éste hasta el volcán Duida o a la misión de Esmeralda, cerca de las fuentes del Orinoco. Desde Esmeralda, Humboldt y Bonpland bajaron con las aguas crecidas todo el Orinoco hasta su delta en Santo Tomé de Guayana o Angostura. Regresaron a Cumaná por las planicies de Cari y las misiones de los indios caribes. Después de una estancia de algunos meses en Nueva Barcelona y Cumaná, nuestros viajeros llegaron a La Habana.

Humboldt permaneció tres meses en la isla de Cuba, donde se ocupó de medir la longitud de La Habana y de la construcción de hornos en los ingenios. Estaba a punto de salir hacia Veracruz, cuando falsas noticias sobre el viaje el Capitán Baudin le hicieron cambiar de plan. Las gacetas anunciaban que este navegante saldría de Francia hacia Buenos Aires y desde allí, por el cabo de Hornos, a Chile y las costas del Perú. Humboldt había prometido





al capitán Baudin y al Musée de París, que buscaría unirse a la expedición desde el mismo momento en que se enterara que tendría lugar. Estas consideraciones obligaron a Humboldt a fletar en Batabanó una pequeña goleta para trasladarse a Cartagena y desde allí, lo antes posible, por el istmo de Panamá al Mar del Sur. Esperaba encontrar al capitán Baudin en Guayaquil o en Lima y visitar con él la Nueva Holanda y las islas del Pacífico.

Humboldt salió de Batabanó en marzo de 1801, costeó el sur de la isla de Cuba, donde determinó varias posiciones astronómicas. La falta de viento alargó mucho esta navegación, las corrientes llevaron la pequeña goleta demasiado al oeste hasta la embocadura del río Atrato. Descansaron en el río Sinú y tuvieron una vuelta penosa a Cartagena. La temporada estaba demasiado avanzada para la navegación en el mar del Sur, lo que obligaba a abandonar el proyecto de cruzar el Istmo. Por ello Humboldt permaneció unas semanas en los bosques de Turbaco y subió en 40 días el río Magdalena, del que esbozó un mapa. Desde Honda subieron hasta Santa Fe de Bogotá, la capital del Reino de Nueva Granada. Las extraordinarias colecciones del sabio José Celestino Mutis, la grande y majestuosa catarata de Tequendama, las minas de Mariquita, de Santa Ana y de Zipaquirá, el puente natural de Icononzo, son las curiosidades que detuvieron a Humboldt y Bonpland hasta el mes de septiembre de 1801. A pesar de la temporada de lluvia, emprendieron el viaje a Quito, pasaron los Andes de Quindío. Desde la ciudad de Cartago, en el Valle del Cauca, bordearon el Chocó y por Buga llegaron a Popayán, donde subieron al cráter del volcán de Puracé.

Desde Popayán pasaron por los desfiladeros de Almaguer a Pasto y de esta ciudad, situada al pie de un volcán, por Tuqueres y la pro-

vincia de los Pastos, a la ciudad de Ibarra y Quito. Su llegada a esta capital se produjo en enero de 1802. Se quedaron cerca de un año en el Reino de Quito. Empezaron expediciones por separado a las montañas nevadas de Antisana, de Cotopaxi, de Tungurahua y del Chimborazo. En todas sus expediciones les acompañó Carlos Montúfar, hijo del marqués de Selva Alegre de Quito, que estaba muy interesado por el progreso de las ciencias. Después de haber acompañado a Humboldt en el resto de su expedición por Perú y el reino de la Nueva España, pasó con él a Europa.

Tras haber examinado el terreno descompuesto en el terremoto de Riobamba de 1797, pasaron por los Andes de Azuay a Cuenca. El deseo de comparar las quinas descubiertas por Mutis en Santa Fe, y las de Popayán, la Cuspa y el Cuspare de Nueva Andalucía y del río Caroní con la quina de Loja y del Perú, hizo que prefirieran no seguir la ruta abierta de Cuenca a Lima, sino pasar -con inmensas dificultades por el transporte de sus instrumentos y colecciones- por el bosque de Saraguro a Loja, y desde allí a la provincia de Jaén de Bracamoros. Tuvieron que cruzar el río Huancabamba, vieron las ruinas de la calzada del Inca, descendieron por el río Chamaya, que les llevó al Amazonas y navegaron por este último río hasta las cataratas de Tomependa. Desde el Amazonas regresaron al sudeste por la cordillera de los Andes a

Montán y visitaron las minas de Hualgayoc. Desde Cajamarca bajaron a Trujillo, en cuyos alrededores se encuentran las ruinas de la inmensa ciudad peruana Mansiche. Siguieron las áridas costas a Santa, Huarmey y Lima, donde permanecieron algunos meses.

Desde Lima nuestros tres viajeros pasaron por mar a Guayaquil - lugar en el que fue redactado el borrador del *Essai sur la géographie des plantes*-, desde donde emprendieron el viaje a México. Navegaron hasta Acapulco, puerto occidental del Reino de Nueva España. Humboldt tenía en principio previsto hacer una estancia de solo unos meses en México y acelerar su vuelta a Europa, pero las circunstancias le obligaron a estar un año en Nueva España.

Los viajeros subieron de Acapulco a Taxco, famoso por sus minas, y desde allí por Cuernavaca llegaron a la capital de México. Esta ciudad, que entonces contaba con 150.000 habitantes, situada en el terreno del antiguo Tenochtitlán, entre los lagos de Texcoco y Xochimilco, era sin duda comparable con las más bellas ciudades de Europa, en opinión de Humboldt. Los grandes establecimientos científicos, como la Academia de Pintura, de Escultura y de Grabado, el Colegio de Minería, el Jardín Botánico, eran instituciones que hacían honor al gobierno que los había creado. Tras una estancia de unos meses en el valle de México y después de haber fijado la longitud de la capital,

Humboldt y sus acompañantes visitaron las minas de Morán y de Real del Monte y el Cerro del Oyamel, donde los antiguos mexicanos fabricaban cuchillos de obsidiana. Poco después pasaron por Querétaro y Salamanca a Guanajuato, una ciudad de 50.000 habitantes y famosa por sus minas.

Desde Guanajuato regresaron por el valle de Santiago a



Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland a los pies del Chimborazo (Friedrich Georg Weitsch, 1810)

ran no seguir la ruta abierta de Cuenca a Lima, sino pasar -con inmensas dificultades por el transporte de sus instrumentos y colecciones- por el bosque de Saraguro a Loja, y desde allí a la provincia de Jaén de Bracamoros. Tuvieron que cruzar el río Huancabamba, vieron las ruinas de la calzada del Inca, descendieron por el río Chamaya, que les llevó al Amazonas y navegaron por este último río hasta las cataratas de Tomependa. Desde el Amazonas regresaron al sudeste por la cordillera de los Andes a



Valladolid, en el antiguo reino de Michoacán. Bajaron de Pátzcuaro en dirección a la costa del océano del Pacífico a las planicies de Jorullo. Llegaron casi hasta el fondo del cráter de este gran volcán de Jorullo, donde analizaron el aire sobrecargado de ácido carbónico. Regresaron a México por el valle de Toluca y en los meses de enero y febrero de 1804 llevaron sus investigaciones hacia la vertiente oriental de la Cordillera. Midieron los Nevados de la Puebla, el Popocatepetl y el Iztaccihuatl, el gran Pico de Orizaba y el Cofre de Perote. Tras una corta estancia en Jalapa, se embarcaron en Veracruz con rumbo a La Habana. Recogieron las colecciones que habían dejado en 1801 y tomaron la vía de Filadelfia para volver en julio de 1804 a Francia. En Estados Unidos visitaron la American Philosophical Society y Humboldt tuvo la oportunidad de conocer al presidente Thomas Jefferson.

Una colección de 6000 especies diferentes de plantas, de las que una gran parte es nueva, observaciones mineralógicas, astronómicas, químicas y morales fueron el resultado de esta expedición, que quedó reflejado además en multitud de obras impresas, aunque hay que destacar su *Voyage aux Régions équinoxiales du Nouveau Continent*, y sus *Ensayos políticos sobre Cuba y Niueva España*, en los que Humboldt hizo los más grandes elogios de la protección con la cual el gobierno español quiso apoyar sus investigaciones.

Tras los primeros meses de estancia en París para iniciar su trabajo científico, Humboldt se trasladó en 1805 a Italia. Allí pudo ver a su hermano Wilhem –entonces embajador ante el Vaticano– y hacer algunas observaciones

en el volcán Vesubio junto a Louis J. Gay-Lussac y Leopold von Buch. Después volvió a Berlín, ciudad en la que recibió todo tipo de honores y fue nombrado chambelán del rey de Prusia, cargo en el que ejerció como consejero y diplomático



Alexander von Humboldt en un retrato realizado por Stieler (1843), en el que se lo muestra portando un cuaderno de su obra magna "Cosmos"

en una situación bélica con Francia muy delicada por la ambición política de Napoleón. Fue la época en la que Humboldt redactó sus preciosos Cuadros de la Naturaleza, antes de poder regresar en 1808 a su querido París, donde continuaba su obra editorial y mantenía reuniones con amigos de la talla de Berthelot, Gay-Lussac, Arago, Chateaubriand, etc., una situación que pudo mantener hasta 1827, fecha en la que marchó a Berlín por orden expresa del rey de Prusia Federico Guillermo III, con el que colaboró estrechamente en la corte de Potsdam. Poco después impartió las conferencias que le hicieron célebre en su tierra y que serían el germen de su futura obra de madurez, el *Cosmos*. En 1829 tuvo además la oportunidad de hacer su anhelada expedición a Siberia, aprobada por el zar Nicolás I –quien le impuso el más absoluto secreto sobre las condiciones de esclavitud de muchos campe-

sinos. Estuvo en este viaje acompañado por el químico Gustav Rose, el zoólogo C. G. Ehrenberg y su criado Seifert. El nuevo periplo comenzó en abril de 1829 y el célebre Humboldt fue recibido con todos los honores por la corte imperial rusa en San Petersburgo. Recorrieron un itinerario que les llevó a Moscú, Nizhnyi Novgorod, Kazan, Perm y los Urales, montes en los que Humboldt debía encontrar diamantes para el zar. Después se dirigieron a Tobolsk, Barnauí, el Altai y la frontera china, desde donde regresaron hacia Omsk, Quirguiz y Kazaj para llegar a Astracán, en las orillas del mar Caspio. El 3 de noviembre del mismo año los expedicionarios llegaban a Moscú, tras un extraño viaje que daría a conocer en su obra sobre Asia Central en 1843. Dos años más tarde comenzó la publicación del *Cosmos*, cuyo cuarto volumen no llegaría hasta 1858, un año antes

de la muerte del genio en Berlín, quien ya preparaba un quinto tomo de su obra de síntesis.



Última fotografía de Alexander von Humboldt



OBRAS DE ALEXANDER VON HUMBOLDT:

Mineralogische Beobachtungen über einige Basalte am Rhein, Braunschweig, 1790; *Flora Fribergensis specimen*, Berlín, 1793; *Versuche über die gereizte Muskel- und Nervenfasern*, 2 vols. Posen-Berlín, 1797 (trad. de D.A.D.L.M., *Experiencias acerca del galvanismo, y en general sobre la irritación de las fibras musculares y nerviosas*, Madrid, Imprenta de la Administración del Real Arbitrio de la Beneficencia, 1803); *Ueber die unterirdischen Gasarten*, Braunschweig, 1799; *Versuche über die chemische Zerlegung des Luftkreises*, Braunschweig, 1799; *Essai sur la Géographie des plantes, accompagné d'un tableau physique des régions équinoxiales*, Paris, chez F. Schoell, et a Tübingue, chez J. G. Cotta, 1807 (trad. de versión preliminar de Jorge Tadeo Lozano, con prefacio y algunas notas por Francisco José de Caldas, *Geografía de las plantas, o cuadro físico de los Andes equinociales y de los países vecinos, Levantado sobre las observaciones y medidas hechas en los mismos lugares desde 1799 hasta 1803, y dedicado, con los sentimientos del mas profundo reconocimiento, al ilustre patriarca de los botánicos, D. José Celestino Mutis. Por Federico Alejandro, Barón de Humboldt*. En: *Semanario de Nuevo Reino de Granada*, núm. 16 del 23 de Abril 1809); con AIMÉ BONPLAND, *Plantes équinoxiales, recueillies au Mexique, dans l'île de Cuba, dans les provinces de Caracas, de Cumana et de Barcelone, aux Andes de la Nouvelle-Grenade, de Quito et du Pérou, et sur les bords du Rio-Negro, de l'Orénoque et de la rivière des Amazones*, Paris, 2 t., chez F. Schoell, 1808-1813; *Ansichten der Natur mit wissenschaftlichen Erläuterungen*. Erster Band. Tübingen: Cotta'sche Buchhandlung, 1808; 1826 y 1849 (trad. de Bernardo Giner, *Cuadros de la naturaleza*, Madrid, Imprenta y librería de Gaspar Editores, 1876); *Essai politique sur le Royaume de la Nouvelle Espagne*, 2 t., a Paris, chez F. Schoell, [1808-, 1811, 1825-27 (trad. de Vicente González Arnao, *Ensayo político sobre el Reino de la Nueva España*, París, en casa de Rosa, 4 t., 1822; 2ª ed. corregida y aumentada en 1827, París, Jules Renouard; numerosas ediciones posteriores); *Vues des Cordillères et Monuments des Peuples indigènes de l'Amérique*, Paris, Schoell, 1810-1813 (trad. de Bernardo Giner, *Sitios de las cordilleras y monumentos de los pueblos indígenas de América*, Madrid, Imprenta Gaspar, 1878); *Recueil d'observations astronomiques, d'opérations trigonométriques, et de mesures barométriques, faites pendant le cours d'un voyage aux régions équinoxiales du Nouveau Continent, depuis 1799 jusqu'en 1803*, Paris, 2 vols., chez F. Schoell, 1810; *Atlas géographique et physique du Royaume de la Nouvelle Espagne*, Paris, chez F. Schoell, 1811; con AIMÉ BONPLAND, *Recueil d'observations de zoologie et d'anatomie comparée, faites dans l'océan Atlantique, dans l'intérieur du Nouveau Continent et dans la mer du Sud pendant les années 1799, 1800, 1801, 1802 et 1803*, Premier volume, a Paris, chez F. Schoell et chez G. Dufour, 1811, Deuxième volume, a Paris, chez J. Smith et chez Gide, 1833; *Atlas géographique et physique des Régions Équinoxiales du Nouveau Continent, fondé sur des observations astronomiques, des mesures trigonométriques et des nivellemens barométriques*, Paris, Librairie de Gide, 1814-1838; con AMATUS BONPLAND y CAROLUS KUNTH, *Nova Genera et Species Plantarum*, Paris, Libreria Graeco-Latino-Germanicae, 7 t., 1815-1825; con AIMÉ BONPLAND, *Monographie des Melastomacées*, Paris, T. 1, Librerie Grecque-Latine-Allemande, 1816, T. 2, chez Gide Fils, 1823; con AIMÉ BONPLAND, *Voyage aux régions équinoxiales du nouveau continent, fait en 1799, 1800, 1801, 1802, 1803 et 1804*, 13 vols., Paris, Gide, J. Smith, 1816-1826 (trad., *Viaje a las regiones equinociales del Nuevo Continente, hecho en 1799 hasta 1804*, 5 tomos, París, Casa de Rosa, 1826); *Tablas geográfico-políticas del Reino de Nueva España que manifiestan su superficie, población, agricultura, fábricas, comercio, minas, rentas y fuerza militar*; México, Imp. de Mariano Ontiveros, 1822; *Essai géognostique sur le gisement des roches dans les deux hémisphères*, Paris, chez F. G. Levrault, 1823; *Essai politique sur l'île de Cuba*, 2 vols., Paris, Gide Fils, 1826 (trad. de D.J.B.de V. y M., *Ensayo político sobre la isla de Cuba*, París, Jules Renouard, 1827); *Tableau Statistique de l'île de Cuba pour les années 1825-1829*, Paris, Gide Fils, 1831 (trad. de Miguel Ángel Puig-Samper et al., *Cuadro Estadístico de la Isla de Cuba para los años 1825 y 1829*, en: *Ensayo político sobre la Isla de Cuba*, Aranjuez, Doce Calles, 1998, págs. 365-398); *Fragmens de Géologie et de Climatologie asiatiques*, 2t., Paris, Gide, 1831; *Examen critique de l'histoire de la Géographie du Nouveau Continent et des progrès de l'astronomie nautique aux Quinzième et Seizième siècles*, 3 vols., Paris, Librairie de Gide, 1836-39 (trad. parcial de Luis Navarro y Calvo, *Cristóbal Colón y el descubrimiento de América. Historia de la geografía del Nuevo Continente y de los progresos de la astronomía náutica de los siglos XV y XVI*, 2 vols., Madrid, Librería de la Viuda de Hernando, 1892); *Asie Centrale. Recherches sur les chaines de montagnes et de la climatologie comparée*, 3 t., Paris, Gide, 1843; *Kosmos*, 5 t., Stuttgart und Tübingen, J. G. Cotta'scher Verlag, 1845-1862 (trad. de Francisco Díaz Quintero, *Cosmos ó Ensayo de una descripción física del mundo*, 2 t., Madrid, Ramón Rodríguez de Rivera Ed., México, Vicente García Torres Ed., 1851-1852; trad. de Bernardo Giner y José de Fuentes, *Cosmos. Ensayo de una descripción física del mundo*, 4 t., Madrid, Gaspar y Roig, 1874-75).




BIBLIOGRAFÍA SOBRE ALEXANDER VON HUMBOLDT (página 1 de 2):

M. de la ROQUETTE, *Humboldt. Correspondance inédite scientifique et littéraire*, Paris, E. Ducrocq, 1865; José R. CARRACIDO, “Alejandro de Humboldt y la ciencia hispano-americana”. *Estudios Histórico-críticos de la ciencia española*, Madrid, Establecimiento Tipográfico de Fortanet, 1897, pp. 71-81; Marcos JIMÉNEZ DE LA ESPADA, “Biaje de Quito a Lima de Carlos Montufar con el Barón de Humboldt y don Alexandro Bompland”, *Boletín de la Sociedad Geográfica de Madrid*, XXIV, Madrid, 1888, pp. 371-389; Eduard LENTZ, “Alexander von Humboldt’s Aufbruch zur Reise nach Süd-Amerika. Nach ungedruckten Briefen Alexander von Humboldt’s an Baron von Forell”, *Wissenschaftliche Beiträge zum Gedächtnis der hundertjährigen Wiederkehr des Antritts von Humboldt’s Reise nach Amerika am 5. Juni 1799*. Aus Anlass des Siebten Internationalen Geographen-Kongresses, herausgegeben von der Gesellschaft für Erdkunde zu Berlin, Berlin, W.H. Köhl, 1899; Karl FÖRSTER, *Die iberische Halbinsel als Arbeitsgebiet Alexander von Humboldts: Spanische Reise im Jahr 1799*, Inaugural-Dissertation an der Philosophischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, 1923; Arturo FARINELLI, *Guillaume de Humboldt et l’Espagne*, Paris, Librairie Félix Alcan, 1930; Amado MELÓN Y RUIZ DE GORDEJUOLA, *Alejandro de Humboldt en la América española. Discurso leído en la solemne apertura del curso académico 1932 a 1933*. Universidad de Valladolid: Tip. Cuesta, 1933; “Humboldt en el conocer de la España peninsular y canaria”, *Estudios Geográficos*, 67-68, Madrid, Mayo-Agosto 1957, pp. 239-259; *Alejandro de Humboldt. Vida y obra*, Madrid, Artes Gráficas Clavileño, 1960; “Triple significación del „gran viaje” de Alejandro de Humboldt”, *Conferencias leídas en la Academia en los días 19 y 22 de octubre de 1959, con motivo del centenario del fallecimiento de Alejandro de Humboldt*, Madrid, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1960, pp. 81-127; Germán BLEIBERG, *Alejandro de Humboldt y España*, Tesis doctoral, Universidad de Madrid, 1958 (Archivo Histórico de la Universidad Complutense, Sign. 3824); “Sobre un viaje frustrado de Humboldt a España”. *Estudios Geográficos*, Madrid 76, 1959, pp. 373-389; Enrique ÁLVAREZ LÓPEZ, “Alejandro de Humboldt y los naturalistas españoles”, *Conferencias leídas en la Academia en los días 19 y 22 de octubre de 1959, con motivo del centenario del fallecimiento de Alejandro de Humboldt*, Madrid, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1960, pp. 129-166; “El viaje a América de Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland y las relaciones científicas de ambos expedicionarios con los naturalistas españoles de su tiempo”, *Anales del Instituto Botánico A.J. Cavanilles*, XXII, Madrid, 1964, pp. 11-60; Alejandro CIORANESCU, *Alejandro de Humboldt en Tenerife*, La Laguna, Instituto de Estudios Canarios, 1960; Leopoldo ZEA, “Humboldt y la independencia de América”, Luis GONZÁLEZ (ed.), *Ensayos sobre Humboldt*, México, Universidad Nacional Autónoma de México, 1962, pp. 104-117; Rafael CANDEL VILA, “Alejandro de Humboldt y los españoles”, *Del Orinoco al Amazonas. Viaje a las regiones equinocciales del Nuevo Continente*, Barcelona, Editorial Labor, 1962, pp. 395-422; Karl BRUHNS, *Alexander von Humboldt. Eine wissenschaftliche Biographie*, 3 vols., Osnabrück, Otto Zeller Verlag, 1969 (1872); Calvin P. JONES, “The Spanish-American works of Alexander von Humboldt as viewed by leading British periodicals”, *The Americas*, Washington DC, XXIX/4, April 1973, pp. 442-448; Ilse JAHN & Fritz G. LANGE (Eds.), *Die Jugendbriefe Alexander von Humboldts 1787-1799*, Berlin, Akademie-Verlag, 1973; Margot FAAK, “Alexander von Humboldt in seinen Beziehungen zu dem spanischen Dichter Enrique Gil y Carrasco”, *Organon*, 12/13, 1977, pp. 233-247; Margot FAAK, (Ed.), *Lateinamerika am Vorabend der Unabhängigkeitsrevolution. Eine Anthologie von Impressionen und Urteilen aus den Reisetagebüchern*, t. 5, Berlin, Akademie-Verlag, 1982; *Alexander von Humboldt. Reise auf dem Rio Magdalena, durch die Anden und durch Mexiko*, t. 8, Berlin, Akademie-Verlag, 1986; *Alexander von Humboldt. Reise auf dem Rio Magdalena, durch die Anden und durch Mexiko*, t. 9, Berlin, Akademie-Verlag, 1990; *Alexander von Humboldt. Reise durch Venezuela*, t. 12, Berlin, Akademie-Verlag, 2000; *Alexander von Humboldts amerikanische Reisejour-nale. Eine Übersicht*. Berliner Manuskripte zur Alexander-von-Humboldt-Forschung, Heft 25, Berlin, Alexander-von-Humboldt-Forschungsstelle, 2002; Charles MINGUET, *Alejandro de Humboldt. Cartas Americanas*, Venezuela, Ayacucho, 1980; *Alejandro de Humboldt: Historiador y geógrafo de la América española (1799-1804)*, 2 vols., México, UNAM, 1985; Douglas BOTTING, *Humboldt y el Cosmos*, Barcelona, Serbal, 1981; José María ARTOLA, “La vocación de Alexander von Humboldt y su relación con España”, *La imagen de España en la Ilustración alemana*, Madrid, Görres-Gesellschaft, 1991; Ottmar ETTE, *Alexander von Humboldt, Reise in die Äquinoctial-Gegenden des Neuen Kontinents*, Frankfurt am Main – Leipzig, Insel Verlag, 2 vols., 1991; “Un espíritu de inquietud moral. Humboldtian Writing: Alexander von Humboldt y la escritura en la Modernidad”, *Cuadernos Americanos*, México, XIII, 4/76, 1999, pp. 16-43; Alexander von Humboldt und das unvollendete Projekt einer anderen Moderne, Velbrück Wissenschaft, 2002; Con Walther L. BERNECKER, (Hg.), *Ansichten Amerikas. Neuere Studien über Alexander von Humboldt*, Frankfurt/Main, Vervuert, 2001; Con Oliver LUBRICH, *Alexander von Humboldt, Kosmos, Entwurf einer physischen Weltbeschreibung*, Die Andere Bibliothek, Eichborn Verlag, 2004; *Alexander von Humboldt, Ansichten der Kordilleren und Monumente der eingeborenen Völker Amerikas*, Die Andere Bibliothek, Eichborn Verlag, 2004; Carlos A. BAUZÁ, “Tres cartas inéditas de Felipe Bauzá a Alejandro de Humboldt”, *Revista de Historia Naval*, Madrid, 39, 1992, pp. 59-74; “Alejandro de Humboldt y Felipe Bauzá: Una colaboración científica internacional en el primer tercio del siglo XIX”, *Revista de Indias*, Madrid, 1994, Vol. LIV, pp. 84-106; Michael ZEUSKE, & Bernd SCHRÖTER (Hg.), *Alexander von Humboldt und das neue Geschichtsbild von Lateinamerika*. Leipzig: Leipziger Universitätsverlag, 1992; Michael ZEUSKE, “¿Padre de la Independencia? Humboldt y la transformación a la Modernidad en la América española”, *Debate y perspectivas. Alejandro de Humboldt y el mundo hispánico. La modernidad y la Independencia americana*, 2000, N.º 1, pp. 67-100;

(Continúa en próxima página)





BIBLIOGRAFÍA SOBRE ALEXANDER VON HUMBOLDT (página 2 de 2):

Manuel LUCENA GIRALDO, "El espejo roto. Una polémica sobre la obra de Alejandro de Humboldt en la Venezuela del siglo XIX", *Dynamis*, 12, Granada, 1992, S. 73-86; "Alejandro de Humboldt y la invención del Trópico", *Humboldt et le monde hispanique*. Paris/Nanterre, Centre de recherches Ibériques et Ibéro-americanas, 2002, pp. 43-58; Ulrike MOHEIT (Ed.), *Humboldt. Briefe aus Amerika. 1799 – 1804*, Berlin, Akademie Verlag, 1993; Manuel HERNANDEZ GONZALEZ, *Alejandro de Humboldt. Viaje a las islas canarias*, La Laguna, Francisco Lemus Editor, 1995; José MIRANDA, *Humboldt y México*, México, UNAM, 1995; Frank HOLL (Ed.), *Alejandro de Humboldt en México*, México, Instituto Nacional de Antropología e Historia, 1997; *Alejandro de Humboldt en Cuba*, La Habana, Oficina del Historiador de la Ciudad, Wissner, 1997; Alexander von Humboldt. *Netzwerk des Wissens*, Berlin-Bonn, 1999-2000; *El regreso de Humboldt*, Quito, Museo de la Ciudad, 2001; con Joaquín FERNÁNDEZ, *El mundo de Alexander von Humboldt*, Barcelona, Lunewerg, 2002; Francisco DÍAZ-FIERROS VIQUEIRA & Daniel ROZADOS GRELA, *Un Novo Mundo para para un home universal. Partida de Humboldt desde A Coruña*, Santiago de Compostela, Consello da cultura galega, 1999; Jaime LABASTIDA, *Humboldt, ciudadano universal*, México, Siglo XXI, 1999; Xosé A. FRAGA VÁZQUEZ, "Un científico alemán en España". *Inter Nationes*, Monografía 126, Bonn 1999, pp. 76-78; con Javier DOSIL MANCILLA, "Características y factores condicionantes de la recepción y difusión de la obra de Humboldt en España en el siglo XIX", *Estudios de Historia das Ciencias e das Técnicas: VII Congreso de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas*, t. I, Pontevedra, 2001, pp. 313-324; Xosé A. FRAGA VÁZQUEZ, "Alexander von Humboldt und Johann Wolfgang von Goethe in der spanischen Naturwissenschaft des 19. Jahrhunderts", In Ilse JAHN y Andreas KLEINERT (Eds.), *Das Allgemeine und das Einzelne- Johann Wolfgang von Goethe und Alexander von Humboldt im Gespräch*. Leopoldina-Meeting am 29. und 30. Oktober 1999 in Halle (Saale), *Acta Historica Leopoldina* N.º. 38, 2003, pp. 33-46; Leoncio LÓPEZ-OCÓN CABRERA, "Un naturalista en el panteón de la ciencia. El culto a Humboldt en el viejo y el nuevo mundo durante el siglo XIX", *Cuadernos Hispano-Americanos*, Nr. 586, Abril 1999, pp. 21-33; PUIG-SAMPER, Miguel Angel, "Humboldt, un prusiano en la Corte del rey Carlos IV". In: *Revista de Indias*, LIX, Madrid, N.º. 216, 1999, pp. 329-355; "España en la memoria de Humboldt y en el olvido de los humboldtianos", *Matices*, N.º. 23, Köln, 1999, pp. 44-45; "La investigación humboldtiana en España. Antecedentes y perspectivas", *Jahrbuch für Geschichte Lateinamerikas*, 37, Köln/Weimar/Wien, Böhlau Verlag, 2000, pp. 347-356; "Humboldt, ein Preusse am Hofe Karls IV", In Ottmar ETTE, Walther L. BERNECKER (Hg.), *Ansichten Amerikas. Neuere Studien zu Alexander von Humboldt*, Frankfurt a.M., Vervuert Verlag, 2001; Con Sandra REBOK, "Un sabio en la meseta: el viaje de Alejandro de Humboldt a España en 1799", *Revista de Occidente*, Julio-Agosto, N.º. 254-255, 2002, pp. 95-125; "La experiencia española de Alejandro de Humboldt y la repercusión de su obra", *Humboldt et le monde hispanique*, Paris/Nanterre, Centre de recherches Ibériques et Ibéro-americanas, 2002, pp. 103-126; "Virtuti et merito. El reconocimiento oficial de Humboldt en España", *HiN. International Review for Humboldtian Studies*, Potsdam-Berlin, V, 8, 2004, pp. 56-67; "El científico y la reina: la concesión de la Gran Cruz de Carlos III a Alexander von Humboldt", *Revista de Occidente*, núm. 280, septiembre 2004, pp. 81-91; Leopoldo ZEA & Mario MAGALLÓN (Eds.), *La huella de Humboldt*, Latinoamérica Fin de Milenio, México, Instituto Panamericano de Geografía e Historia, 2000, pp. 31-67; Horst FIEDLER & Ulrike LEITNER, *Alexander von Humboldts Schriften. Bibliographie der selbstständig erschienenen Werke*, Beiträge zur Alexander-von-Humboldt-Forschung, t. 20, Berlin, Akademie Verlag, 2000; Alberto CASTRILLÓN, *Alejandro de Humboldt, del catálogo al paisaje*, Medellín, Universidad de Antioquia, 2000; Ingo SCHWARZ, "Shelter for a Reasonable Freedom" or Cartesian Vortex". In: *Debates y perspectivas. Alejandro de Humboldt y el mundo hispánico*, N.º. 1, Madrid, Fundación Histórica Tavera, 2000; "Alexander von Humboldt – Socio-political Views of the Americas", In Ottmar ETTE & Walther L. BERNECKER (Hg.), *Ansichten Amerikas. Neuere Studien zu Alexander von Humboldt*. Frankfurt a. Main, Vervuert Verlag, 2001; Consuelo NARANJO OROVIO, "Humboldt en Cuba: reformismo y abolición", *Debate y perspectivas. Alejandro de Humboldt y el mundo hispánico. La Modernidad y la Independencia americana*, Madrid, Fundación Histórica Tavera, 2000, pp. 183-201; Joaquín FERNÁNDEZ PÉREZ, "El segundo centenario de la llegada a España de Alexander von Humboldt", *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 97, Madrid, 2000, pp. 61-67; *Humboldt. El descubrimiento de la naturaleza*, Tres Cantos, Nivola, 2002; Sandra REBOK, "La percepción de las ideas de Alejandro de Humboldt en la prensa española durante la primera mitad del siglo XIX", *Debate y perspectivas. Alejandro de Humboldt y el mundo hispánico. La modernidad y la Independencia americana*, 2000, N.º. 1, pp. 125-149; "Alejandro de Humboldt y el modelo de la Historia Natural y Moral", *Humboldt im Netz* (<http://www.uni-potsdam.de/u/romanistik/humboldt/hin>), N.º. 3/2001, Berlin/Potsdam; "Alejandro de Humboldt en Cuba: reflexiones historiográficas", *El Caribe Hispano. Sujeto y objeto en política internacional*, Josef OPATRŇY (Ed.), (Supplementum Nr. 9 der *Ibero-Americana Pragensia*), Praga, Universidad Carolina de Praga, Editorial Karolinum, 2001; "Alexander von Humboldt im Spiegel der spanischen Presse: Zur Wahrnehmung seiner Person und seiner Ideen während der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts", *Humboldt im Netz* (<http://www.uni-potsdam.de/u/romanistik/humboldt/hin>), N.º. 4/2002, Berlin/Potsdam; "Alexander von Humboldt and the Colonial Societies of Spanish America", *International Seminar on the History of the Atlantic World, 1500-1825*. Working Paper. Harvard University, Cambridge, 2002; "El arte al servicio de la ciencia: Alexander von Humboldt y la representación iconográfica de América", Publicación auf CD del 51º Congreso Internacional de Americanistas, celebrado en Santiago de Chile, 14-18 de Julio 2003; Teodoro HAMPE MARTÍNEZ, "Carlos Montúfar y Larrea (1780-1816), el quiteño compañero de Humboldt". *Revista de Indias*, Madrid, 2002, Vol. LXII, N.º. 226, pp. 711-720; Estuardo NÚÑEZ y Georg PETERSEN, *Alexander von Humboldt en el Perú*, Lima, Banco Central de Reserva del Perú, 2002.



Miguel Ángel Puig-Samper miguelangelpuig@cchs.csic.es
Profesor de Investigación del Departamento de Historia de la Ciencias
Instituto de Historia (CSIC)