

INSTITUTO DE ESPAÑA

**ANALES**  
de la  
**REAL ACADEMIA**  
**NACIONAL**  
**DE**  
**FARMACIA**



2000

VOLUMEN LXVI

Núm. 2

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID



Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

## **Revisión**

### **Les pharmaciens suisses et la science : une autre histoire de la pharmacie helvétique**

PROF. FRANÇOIS LEDERMANN  
*Université de Berne (Suisse)*

#### RESUME

En histoire de la pharmacie, les études biographiques permettent entre autres de souligner l'activité des pharmaciens au service de la science, de montrer combien les pharmaciens ont apporté à diverses périodes de l'histoire aux différentes disciplines scientifiques qui composent la pharmacie. L'exemple de la pharmacie helvétique et la prise en compte d'une dizaine d'apothicaires suisses qui ont vécu du XVI<sup>e</sup> au XX<sup>e</sup> siècle donne une idée de la diversité des contributions des pharmaciens au progrès scientifiques. Ces extraits biographiques font ressortir un certain nombre d'éléments qui parsèment l'histoire de la pharmacie suisse : par exemple l'importance de la botanique, mais aussi le sens de la collection, le rôle des sociétés savantes, puis de l'Université, enfin l'essor de l'industrie au cours du XIX<sup>e</sup> siècle. Il appert de cette courte analyse que par sa place comme charnière entre pratique et théorie, le pharmacien a toujours occupé une position centrale dans le développement scientifique.

**Mots-clés:** Suisse.- Pharmacie.- Biographie.- Science.

#### RESUMEN

#### **Los farmacéuticos suizos y la ciencia: Otra historia de la farmacia helvética**

Los estudios biográficos permiten destacar la actividad de los farmacéuticos al servicio de la ciencia a través de la historia y demostrar quien entre ellos ha realizado aportaciones a las diferentes disciplinas científicas en los distintos períodos históricos.

La Farmacia suiza cuenta con una decena de farmacéuticos que desde el siglo XVI al XX han contribuido de manera diversa al progreso científico. Sus biografías permiten establecer una serie de factores importantes que jalonan la historia de la farmacia como por ejemplo : la botánica, el coleccionismo, las sociedades científicas, la Universidad, la industrialización en el siglo XIX. Se percibe en este análisis que el farmacéutico ha ocupado siempre una posición central en el desarrollo científico.

**Palabras clave :** Suiza.- Farmacia.- Biografía.- Ciencia.

## **1. La biographie et l'histoire de la pharmacie**

A quoi sert la biographie en histoire de la pharmacie ou de la médecine ? A illustrer la vie de pharmaciens du passé et, bien souvent, à défendre et à célébrer la profession<sup>i</sup>. Mais les études biographiques, en histoire de la pharmacie comme dans l'histoire générale, peuvent également servir de soutien, ou de modèle, à des études de type sociologique, à une analyse des origines sociales et des structures familiales, des dynasties, par exemple, ou encore à une analyse des phénomènes d'immigration - qui ont joué en Suisse un rôle important<sup>ii</sup>. La biographie pourra aussi mettre en évidence l'activité des pharmaciens au service des arts, de la musique, de la peinture, de la littérature... et nombreux sont nos collègues qui dans le passé se sont illustrés dans ces domaines, leurs oeuvres souvent fort bien étudiées par les historiens de la pharmacie. Et enfin, les études biographiques pourront souligner et éclairer les pharmaciens comme scientifiques, comme savants, comme chercheurs dans les différentes disciplines que composent la pharmacie. Car pour tout le spectre des sciences-naturelles, les pharmaciens, par leur formation où se mêlent pratique et théorie, par leur tournure d'esprit, mais aussi par l'instrument de travail que leur offre le laboratoire de leur officine, sont souvent les mieux placés pour se consacrer aux sciences. C'est ce type d'éclairage que nous tenterons aujourd'hui à l'image de la pharmacie helvétique<sup>iii</sup>.

## **2. Quelques éléments de l'histoire de la pharmacie en Suisse**

Mais d'abord quelques mots sur l'histoire générale de la pharmacie en Suisse<sup>iv</sup>. Une appréhension n'est guère possible que si l'on

considère le caractère fédéraliste de la Suisse et la longue marche des différentes régions, des divers États, vers une lente unification qui n'advient qu'au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle. En ce qui concerne la pharmacie, elle ne se développera tout d'abord que dans les régions urbaines, en premier lieu à Bâle et à Genève, puis à Zurich, à Berne et ensuite dans les autres villes et régions de Suisse<sup>v</sup>.

Grâce aux recherches approfondies de l'historien de la pharmacie Josef Anton Häfliger, la situation à Bâle est bien connue<sup>vi</sup>. Les premiers apothicaires y apparaissent vers 1280, donc peu après les Constitutions de Frédéric II qui consacrent dans le Sud de l'Italie la séparation de la médecine et de la pharmacie et la naissance de cette nouvelle profession.

Vers 1320 déjà, un serment des apothicaires bâlois forme les bases juridiques et économiques de la pharmacie bâloise. À Genève aussi, les premiers apothicaires apparaissent à la fin du XIII<sup>e</sup> siècle ; ce sont surtout des émigrés italiens, piémontais, qui s'occupent du commerce des drogues dans la plaque tournante économique et la ville de foire qu'était Genève au moyen âge, où l'exercice de la pharmacie est libre. Ce n'est qu'au XVI<sup>e</sup> siècle qu'apparaissent les premiers règlements qui ordonnent pour Genève les conditions d'exercice de la pharmacie, les modalités d'enseignement, les rapports aux médecins, etc.<sup>vii</sup>. En même temps, Genève voit affluer nombre d'apothicaires français, des réfugiés huguenots, donc de religion réformée, qui fuient la France où ils sont persécutés. Au moyen âge, Zurich aussi connaît plutôt une forme de pharmacie marchande où les apothicaires occupent une place importante dans la vie économique, politique et administrative de l'État alors qu'à Berne, les apothicaires de la fin du moyen âge occupent plutôt un rôle comme représentants des professions de la santé, à côté des médecins<sup>viii</sup>.

Ce n'est qu'avec les Lumières, à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, que la pharmacie suisse, comme d'ailleurs la pharmacie européenne, prend un tournant décisif, qu'elle se modernise et qu'elle s'organise<sup>ix</sup>. Les pharmaciens prennent part, comme nous le verrons, à la vie scientifique du pays, ils participent, et c'est nouveau, à la rédaction de pharmacopées, et s'organisent professionnellement avec la création de sociétés, fédérales ou nationale. La Société suisse de pharmacie est créée en 1843<sup>x</sup>. C'est aussi durant le XIX<sup>e</sup> siècle qu'apparaissent les premières revues

scientifiques et, en 1847, le premier Journal suisse de pharmacie. Les principaux problèmes qui préoccupent les pharmaciens suisses depuis le milieu du XIX<sup>e</sup> siècle sont la propharmacie, donc la dispensation des médicaments par les médecins, et la concurrence des autres professions comme les droguistes, ceci dans un pays où, au contraire de nombreuses autres nations européennes, la liberté du commerce a trop souvent pris le pas sur les nécessaires exigences de la santé publique<sup>xi</sup>. Le XX<sup>e</sup> siècle, marqué en Suisse comme partout par une puissante industrialisation du médicament, n'a pas vu ces problèmes se résoudre et la pharmacie suisse se trouve en ce moment dans une phase structurelle et conjoncturelle difficile, marquée par une mise en cause du monopole pharmaceutique, mais aussi par une critique continue des acquits commerciaux des pharmaciens.

### **3. Les pharmaciens suisses jusqu'à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle : une position originale et parfois ambiguë**

Comme je l'ai fait remarquer tout à l'heure en survolant l'histoire de la pharmacie helvétique, les pharmaciens suisses du moyen âge et de la Renaissance sont soit des marchands de drogues avec un rang élevé dans la société, soit des apothicaires de ville, respectés, mais plutôt artisans que scientifiques, reflétant ainsi la pharmacie de cette époque.

Pour les trois siècles qui vont de la fin du moyen âge - avec une première expansion de la pharmacie suisse - jusqu'aux Lumières, à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, seules quelques personnalités émergent qui ont contribué à la vie scientifique en Suisse.

L'un des premiers, chronologiquement, signalé par les biographes est Thibault Lespleigney. D'origine française, il vécut au début du XVI<sup>e</sup> siècle. Il a longtemps exercé la pharmacie à Tours, au bord de la Loire, puis, après avoir choisi la religion réformée, à Genève où il s'est exilé. A une époque où la littérature pharmaceutique était majoritairement rédigée par les médecins, Lespleigney s'est illustré comme auteur de plusieurs ouvrages de pharmacie dont l'un parut en langue française, une curiosité à l'époque où le latin dominait encore. Autre originalité, certains ouvrages de Lespleigney sont rédigés en vers, comme par exemple le *Promptuaire des médecines simples en rithme joyeux* publié à Tours en 1537 dans

lequel l'auteur décrit certaines substances pharmaceutiques minérales, végétales et animales en vers, en strophes de huit syllabes<sup>xii</sup>.

Une autre personnalité extraordinaire de la même époque est le pharmacien de Lucerne Renward Cysat. Il exerça la pharmacie d'officine à Lucerne dans la seconde moitié du XVI<sup>e</sup> siècle, mais occupa également d'importantes charges administratives, politiques et diplomatiques<sup>xiii</sup>. Dans le domaine scientifique, c'est plutôt à la botanique que Cysat se voua. Il possédait un jardin près de sa pharmacie où il planta des espèces alors inconnues en Suisse comme les tulipes ou encore le laurier-rose qu'il fit venir de Florence grâce à ses relations diplomatiques. Cysat correspondit aussi avec des médecins importants de la Renaissance, comme par exemple Félix Platter. Signe du temps, il constitua également un herbier et consigna par écrit toutes ses observations scientifiques.

Renward Cysat peut ainsi être considéré comme un précurseur d'une forme d'activité scientifique qui ne prendra véritablement son essor que durant le XVII<sup>e</sup> siècle, le collectionnisme, une activité à laquelle plusieurs pharmaciens, dans l'Europe entière, prendront une part importante. Nous en avons un exemple pour le début du XVIII<sup>e</sup> siècle à Bâle avec le pharmacien Hieronymus Bernoulli, membre d'une dynastie familiale qui compta nombre de scientifiques et de mathématiciens. Bernoulli créa un cabinet de curiosités naturelles et constitua une importante collection de minéraux et de fossiles, insectes, mollusques, etc. Cet art de la collection prélude à une vision plus structurée, plus scientifique des sciences-naturelles, comme la pratiqueront plusieurs pharmaciens suisses du début du XIX<sup>e</sup> siècle.

Un peu plus tard, au tournant des XVI<sup>e</sup> et XVII<sup>e</sup> siècles, un autre personnage, Jacques Constant de Rebecque, à la fois médecin et pharmacien, ce qui montre l'imbrication des deux professions à cette époque, rédige en 1709 une pharmacopée dans laquelle il veut montrer qu'il est possible de renoncer aux drogues exotiques, étrangères, et que les seules plantes qui poussent en Suisse suffisent à couvrir tout le champ de la thérapeutique<sup>xiv</sup>.

Par cette démarche, Constant de Rebecque qui mêle ainsi nationalisme et pharmacie s'inscrit ainsi dans une ligne courante alors,

qui se caractérise non seulement par la défense des valeurs locales, mais aussi par une forme de résistance, anti-moderniste, aux thérapeutiques exotiques, signe de progrès

#### **4. Vers 1800 : la pharmacie suisse intègre les sciences-naturelles**

Vers 1800, la ville de Genève, influencée par la Révolution française, se trouve au centre d'un profond mouvement scientifique ; elle forme véritablement un creuset où se forment et se développent la physique, la chimie et la médecine. Aussi n'est-il pas étonnant de constater que plusieurs pharmaciens genevois ont joué un rôle essentiel dans cet élan de progrès des sciences, et des sciences-naturelles en premier lieu. Nous pouvons l'observer avec trois exemples.

Le premier pharmacien genevois de cette époque qui mérite d'être évoqué ici est Henri-Albert Gosse<sup>xv</sup>. D'origine genevoise, Gosse fut l'un des premiers pharmaciens suisses à compléter sa formation de type artisanal par des cours à l'université, d'abord à Genève même, puis à Paris où il se rendit comme de nombreux jeunes autres suisses romands de cette période pour achever sa formation. Il y étudia la chimie et la physique et devint en 1798 maître-apothicaire à Genève et ouvrit une pharmacie. Mais c'est surtout pour son activité au service de la science que Gosse est resté dans la mémoire : il fut un précurseur de l'aviation, fut aussi un des pionniers de l'industrie, il dirigea une fabrique de poterie et il réalisa des recherches chimiques sur les maladies professionnelles des orfèvres situant ainsi des travaux dans une ligne très moderne qui correspondait aux premières poussées de l'industrie à Genève. Gosse est aussi connu pour, avec un certain Monsieur Schweppe, le futur créateur du Schweppes, avoir lancé des eaux minérales. Il fut surtout le créateur en 1815 de la Société helvétique des sciences-naturelles, la première société savante dans le pays. Avec Gosse, on note donc les véritables orientations scientifiques d'un pharmacien d'officine et son action au service de la science naissante, mais Gosse reste un généraliste, intéressé plus par le renouveau scientifique que par une recherche scientifique précise..

Avec un deuxième pharmacien genevois, également actif autour de la période de 1800, nous retrouvons l'intérêt pour les sciences

naissantes, mais aussi le goût de la collection, les deux passions étant à cette époque bien souvent étroitement imbriquées. Jean-Antoine Colladon, après des études à Montpellier et à Berlin, retourna à Genève où il rassembla des collections de plantes médicinales des Alpes et où il constitua un herbier. Il effectua également des recherches sur les caractères héréditaires et sur l'hybridation des souris blanches, quarante ans avant Mendel, mais il fut incapable, contrairement au moine allemand, d'élaborer une explication générale, une théorie, des phénomènes qu'il observa.

Un troisième pharmacien genevois, contemporain de Gosse et de Colladon, Pierre François Tingry, également propriétaire d'une officine, effectua des recherches dans le domaine de la chimie et sur certains médicaments. Comme Gosse, il s'intéressa aux maladies professionnelles dues aux produits chimiques, au mercure en particulier, et il fit de sa maison de campagne un lieu de réunion pour nombre de savants de passage à Genève. Tingry fut aussi un pionnier parmi une catégorie de pharmaciens qui va croître au cours du XIX<sup>e</sup> siècle, comme nous allons le voir, celui des enseignants : il fut en 1807 le premier titulaire de la chaire de chimie et de minéralogie de l'Académie de Genève, précurseur de l'Université.

On le constate aisément avec ces trois exemples, le pharmacien d'officine - et cela ne vaut pas que pour la Suisse - par sa formation à la fois pratique et théorique, par le laboratoire et le matériel de la pharmacie, mais aussi par ses intérêts intellectuels et son ouverture au progrès, joue un rôle essentiel dans le développement naissant des sciences et dans les premiers contacts entre savants. Bénéficiaire souvent d'une bonne formation, il pénètre vers 1800 à l'université, comme étudiant et parfois comme enseignant. On retrouvera tous ces éléments, l'enseignement, la recherche, le rôle social et même le sens de la collection dans le cours du XIX<sup>e</sup> siècle, une période que l'on peut nommer âge d'or de la pharmacie scientifique.

## 5. Le XIX<sup>e</sup> siècle ou le règne de la pharmacie scientifique

Avec l'ouverture de la pharmacie à la science, avec le rôle joué dans ce mouvement par les pharmaciens d'officine et surtout avec les changements qui interviennent après 1800 dans la thérapeutique, avec l'abandon de nombreuses substances animales et végétales, avec aussi la suppression de maintes pratiques polypharmaceutiques, et surtout avec l'introduction dans la matière médicale de la morphine, de la codéine, de la quinine et d'autres alcaloïdes, avec enfin un balancement de la fabrication vers l'analyse des médicaments, la pharmacie de tous les jours change de visage. Les travaux effectués par les pharmaciens d'officine, toujours aux avant-postes de la recherche scientifique et médicale, illustrent ce changement. C'est le cas par exemple du pharmacien de la ville de Berne Samuel Pagenstecher<sup>xvi</sup>.

Après des études en Allemagne, chez Trommsdorf à Erfurt et à Göttingen, Pagenstecher reprit en 1805 la pharmacie paternelle. Il est l'auteur de travaux sur les eaux minérales, mais surtout, il fut le premier à découvrir de la morphine dans l'opium indigène, quelques années après que Sertürner eut isolé cet alcaloïde. Il détecta aussi la présence d'aldéhyde salicylé dans les fleurs de la spirée et devint ainsi l'un des précurseurs de la thérapeutique salicylée. Il est aussi resté dans l'histoire de la pharmacie comme le découvreur d'une méthode d'essai du cuivre avec de l'acide cyanique et du bois de gaiac. Cette dernière découverte montre bien l'imbrication, à cette époque, des activités scientifiques et des aspects pratiques, ou technologiques de la recherche. C'est en analysant l'eau de laurier-cerise, alors polluée par le cuivre, que Pagenstecher mit au point sa méthode d'essai.

Un autre pharmacien bernois de la même période, Carl Abraham Fueter, procéda aussi à des recherches analytiques, mais il est surtout connu comme l'auteur de la seule pharmacopée bernoise, le *Tentamen Pharmacopoeae Bernensis*, paru en 1852<sup>xvii</sup>. Ce nouveau domaine d'activité éclaire par un autre angle l'activité des pharmaciens de cette époque : alors que la rédaction des ouvrages de pharmacopée fut longtemps l'apanage des médecins, dès 1800, sous l'impulsion des

changements dans la matière médicale et mais surtout grâce à la nouvelle orientation de la pharmacie, de plus en plus de pharmaciens participent à l'élaboration des formulaires pharmaceutiques. Dans la même optique, on pourra citer le pharmacien zurichois Karl Dünnenberger qui rédigea à la fin du siècle, en 1896, le commentaire de la troisième édition de la Pharmacopée helvétique<sup>xviii</sup>

Ce riche XIX<sup>e</sup> siècle, avec ses changements marquants dans l'usage des médicaments, voit poindre les premières formes d'industrialisation du médicament, un domaine dans lequel les pharmaciens, à l'instar de maints collègues étrangers, vont jouer un rôle de premier plan<sup>xix</sup>.

L'un des premiers est le pharmacien zurichois Theodor Hübschmann, par ailleurs fondateur en 1843 de la Société suisse de pharmacie<sup>xx</sup>. D'origine allemande, comme beaucoup d'apothicaires helvétiques du XIX<sup>e</sup> siècle, et parmi les plus actifs, Hübschmann se dédie dans les années quarante à la fabrication industrielle de quelques alcaloïdes, d'abord dans le laboratoire de son officine, puis dans une fabrique attenante.

L'officine pharmaceutique et les pharmaciens, point de départ de l'industrie pharmaceutique, la Suisse en fournit de nombreux exemples. Sauter à Genève, Siegfried dans le canton d'Argovie qui créera et développera une entreprise de commerce des produits pharmaceutiques et qui sera l'un des premiers en Suisse à fabriquer des substances synthétiques, et bien sûr Wander et Nestlé. Après des études de pharmacie, Albert Wander reprit de son père un petit laboratoire de produits chimiques qui connaîtra un développement fulgurant après l'introduction des extraits de malt, domaine de recherche favori de Wander, et la mise sur le marché de l'*Ovomaltine*®. La fabrique Wander, sous l'impulsion de son directeur, devient dans le cours du XX<sup>e</sup> siècle une multinationale du médicament qui produit tout à la fois des produits diététiques et des médicaments.

Encore plus exemplaire est le cas de Henri Nestlé D'origine allemande, dont la formation de pharmacien est mal connue, il quitta dans les années trente son pays pour des raisons politiques et vint s'établir dans

le canton de Vaud où il exerça la pharmacie. Il reprit ensuite un petit laboratoire qu'il porta au succès en fabriquant une farine pour enfants, un produit qu'il développa et commercialisa avant de transformer son entreprise en *Société Nestlé* dont la réussite ultérieure et l'importance internationale est bien connue.

La pharmacie d'officine comme creuset de la recherche scientifique et du développement de l'industrie va au XIX<sup>e</sup> siècle de pair avec une reconnaissance toujours plus éclatante de la place de la pharmacie dans les universités, dans le monde académique. Et de nombreux pharmaciens suisses participent à ce mouvement. L'enseignement universitaire officiel et autonome ne se met en place en Suisse que tard, dans les dernières décennies du XIX<sup>e</sup> siècle. Aussi les premiers professeurs pharmaciens occupent des chaires dans diverses facultés, médecine, sciences-naturelles, et donnent des cours destinés aux futurs pharmaciens, mais aussi à d'autres étudiants, comme par exemple les médecins.

Le bernois Karl Emanuel Brunner fait partie de cette première génération de pharmaciens-enseignants. Après des études à Berlin, à Göttingen et à Paris - on constate donc une fois de plus l'importance des universités étrangères, allemandes et françaises en particulier, dans la formation des apothicaires de ce temps - il fut nommé professeur ordinaire de chimie à l'Université de Berne. Avec les moyens en argent et en matériel dérisoires que lui allouait l'État, il créa un laboratoire de chimie où il pratiqua des expériences sur la fabrication des métaux et où il développa des procédés analytiques nouveaux pour les médicaments. Il s'adressait alors, dans la première moitié du XIX<sup>e</sup> siècle, à un auditoire constitué de quelques pharmaciens, mais aussi de médecins et d'étudiants en chimie. Il était aussi propriétaire d'une officine dans la ville de Berne.

Un peu plus tard, dans la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> siècle, à Genève, un autre pharmacien, Jacques-Joseph Brun, fut nommé professeur de matière médicale et de pharmacologie à l'Université de Genève, puis il enseigna la microscopie pharmaceutique et la pharmacognosie à une époque où l'enseignement de la pharmacie n'était pas encore institutionnalisé dans la cité de Calvin. Un autre aspect de la vie de Brun montre bien l'ouverture aux sciences et les enthousiasmes de nombreux

pharmaciens du XIX<sup>e</sup> siècle où l'on retrouve le sens de la collection : il se spécialisa dans l'étude des diatomées fossiles et vivantes et constitua une collection comptant plusieurs milliers d'espèces. Pour assouvir cette passion, il fit de nombreux voyages. Le voyage scientifique, complément du sens de la collection, voici une autre constante de l'histoire des sciences aux XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles.

Mais la fin du XIX<sup>e</sup> siècle voit apparaître ensuite des instituts de pharmacie autonomes attachés à Lausanne et à Bâle aux Facultés des Sciences, à Zurich à l'École Polytechnique Fédérale, et à Berne à la Faculté de Médecine<sup>xxi</sup>. Ces créations d'Écoles de Pharmacie accompagnent la reconnaissance officielle de la pharmacie comme discipline universitaire par une loi fédérale, donc valable pour toute la Suisse, de 1877. Ce mouvement accompagne l'arrivée de véritables enseignants pour les futurs pharmaciens, professeurs, et souvent directeurs de ces nouveaux instituts.

L'un des premiers, et des plus connus dans le monde scientifique et pharmaceutique, est le pharmacien bernois Friedrich August Flückiger. Après une formation de pharmacien et des études en Allemagne et à Paris, Flückiger exerce comme pharmacien d'officine puis comme chef de la Pharmacie d'État du canton de Berne. C'est dans cette fonction qu'il commence à donner des cours destinés aux pharmaciens de l'Université de Berne et il sera nommé en 1867 professeur de pharmacie, ce qui institutionnalisera réellement l'enseignement de la pharmacie à Berne. C'est aussi Flückiger qui a véritablement porté la pharmacognosie, donc l'étude de la matière médicale, au rang de discipline scientifique ; il est l'auteur d'ouvrages fondamentaux dans ce domaine.

En 1873, il quitte Berne, où ses ambitions académiques étaient limitées par l'absence d'un Institut de Pharmacie, pour l'Université de Strasbourg où il prend le poste de directeur de l'Institut pharmaceutique, nouvellement repris par les Allemands après la défaite française et la perte de l'Alsace-Lorraine.

Moins de vingt ans plus tard, un Institut de Pharmacie est créé au sein de la Faculté de Médecine. Il sera dirigé pendant plus de quarante ans par Alexander Tschirch, un pharmacien d'origine allemande. Tschirch est

une des personnalités les plus marquantes, les plus fascinantes aussi, de la pharmacie de cette époque. Successeur de Flückiger dans le domaine de la pharmacognosie, il a fait reconnaître la science pharmaceutique comme telle dans le monde entier. Spécialiste de l'anatomie végétale, en particulier des glucosides anthrachinoniques, auteur de plusieurs ouvrages, de très nombreux travaux, il dirigea aussi de nombreuses thèses de doctorat avec des élèves venus de beaucoup de pays. Comme universitaire, Tschirch a toujours rattaché la recherche scientifique à la pratique pharmaceutique quotidienne : il rédigea dans une large mesure la quatrième édition de la Pharmacopée helvétique et se préoccupa sans relâche de questions d'ordre professionnel. Ainsi, il caractérise bien une génération de professeurs de pharmacie à une époque, avant l'industrialisation du médicament, où les divergences entre le travail de tous les jours du pharmacien d'officine et la recherche universitaire allaient encore de pair.

Carl Hartwich, un autre pharmacien venu d'Allemagne et professeur à Zurich constitue un autre exemple de professeur engagé, à la fois chercheur scientifique et proche de la pratique pharmaceutique.

## **6. Après 1900 : les universitaires remplacent les officinaux : une spécialisation dommageable ?**

Le XX<sup>e</sup> siècle ne compte plus guère de pharmaciens d'officine qui mènent parallèlement une activité scientifique. Les progrès de la thérapeutique, les succès des médicaments industriels, de la spécialité pharmaceutique, un autre visage de la pharmacie d'officine, plus orienté vers le conseil au patient, introduisent, en Suisse comme ailleurs en Europe, un clivage entre le monde des chercheurs, universitaires ou opérant dans l'industrie, et celui des hommes et, toujours plus, des femmes, qui délivre des médicaments. Pour ce siècle donc, le cercle des scientifiques se réduit aux enseignants. Peu d'exemples suffiront pour illustrer ce changement.

Le premier, Eduard Schär, éclaire encore une période de transition entre le XIX<sup>e</sup> et le XX<sup>e</sup> siècle. Ayant acquis à l'origine une formation traditionnelle de pharmacien, avec des périodes d'apprentissage et de compagnonnage, il poursuit ses études à Berlin, à Londres et à Paris. Il

reprend d'abord la gérance d'une pharmacie dans le canton de Berne mais se tourne ensuite définitivement vers la science et l'enseignement, à Zurich d'abord, à Strasbourg ensuite où il prend la succession de Flückiger. Toutefois, les domaines de recherche de Eduard Schär sont en partie consacrés à la pharmacie pratique, à l'analyse pharmaceutique, à la chimie des denrées alimentaires, à la description des plantes... il participe aussi à la rédaction de la Pharmacopée helvétique. Au début du siècle, Robert Chodat, professeur de botanique à l'Université de Genève, doyen de la Faculté des Sciences et Recteur de l'Université, débuta aussi sa carrière comme pharmacien d'officine.

Au milieu de ce siècle, Paul Casparis, directeur de l'Institut de Pharmacie de l'Université de Berne, s'efforça encore de maintenir un équilibre entre ses activités académiques - il travailla à la fois sur certains principes actifs végétaux et sur des questions de galénique - et les exigences pratiques du métier de pharmacien. Sa fonction de rédacteur du journal professionnel des pharmaciens suisses en témoigne comme son travail au sein de la commission de la Pharmacopée helvétique. D'autres enseignants comme Boymond à Genève, ou encore Flück et Büchi à Zurich font, encore la liaison, par leurs recherches ou certaines activités rédactionnelles ou professionnelles entre les deux cercles de la pharmacie.

Dans le dernier tiers du siècle, les enseignants en pharmacie dans les universités s'éloignent de plus en plus de la pratique pharmaceutique et la césure entre le monde académique et le pharmacien d'officine s'élargit.

Comment ne pas terminer par l'histoire de la pharmacie ? Dans le domaine des recherches sur le passé pharmaceutique, plusieurs pharmaciens suisses se sont illustrés, ceci dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle à une époque où l'histoire de la pharmacie sort des limbes.

L'un des premiers fut Burkhard Reber, pharmacien de l'Hôpital de Genève<sup>xxii</sup>. C'est, une fois encore, le sens de la collection qui mit Reber sur la voie de l'histoire de la pharmacie. Il constitua un ensemble de ce qu'il appela *Antiquités au point de vue de l'histoire de la médecine, la pharmacie et les sciences-naturelles*, une activité méconnue alors par ses confrères locaux jusqu'à ce que Flückiger lui rende hommage après avoir

admiré les objets réunis par le pharmacien genevois. Reber est aussi l'auteur d'une *Galerie des thérapeutes et des pharmacognostes les plus fameux*, un ouvrage biographique. C'est aussi vers 1900 qu'un pharmacien d'officine bâlois, Christian Engelmann se mit à collectionner des objets se rapportant à l'histoire de la pharmacie, un ensemble qu'il remit en 1926 au Musée d'histoire de la pharmacie de Bâle à peine fondé alors par Josef Anton Häfliger.

Häfliger, propriétaire d'une officine dans la ville de Bâle, peut être considéré comme le véritable pionnier de l'histoire de la pharmacie en Suisse et dans le monde. Contemporain et ami de Folch Andreu, il enseigna l'histoire de la pharmacie à l'Université de Bâle et fut ainsi l'un des premiers professeurs en ce domaine dans le monde. Il transforma sa petite collection particulière en musée, l'un des plus importants au niveau international pour l'histoire de la pharmacie. Il fut aussi l'auteur de nombreux travaux historiques, en particulier sur les origines et le développement de la pharmacie bâloise et helvétique. Il eut aussi la charge de président de la Société internationale d'histoire de la pharmacie.

Si Häfliger représentait encore une vision très traditionaliste de l'histoire de la pharmacie, où la biographie et les études institutionnelles prennent le pas sur les études plus analytiques, son successeur à la tête du Musée bâlois, Alfons Lutz, pharmacien d'officine également, devint l'un des maîtres de la recherche sur les antidoitaires et les pharmacopées du moyen âge et de la Renaissance. Il donna ainsi à l'histoire de la pharmacie, pour la Suisse et pour le monde entier, une impulsion vers la recherche des sources et des problèmes liés au passé du médicament.

Cette promenade à travers plus d'un demi-millénaire de pharmacie helvétique, par l'observation de plusieurs apothicaires ou pharmaciens, révèle une fois de plus l'ambivalence de la profession pharmaceutique, écartelée entre le commerce, l'artisanat et la recherche scientifique. L'attention portée à diverses périodes montre que ce morcellement a toujours existé mais que le pharmacien a constamment louvoyé, cherché sa voie entre ces différents éléments. Ceci en fonction du cadre législatif et social, mais aussi des réalités de la thérapeutique et de son évolution.

Voilà : par ce survol forcément sommaire et lacunaire, j'ai voulu montrer, à travers la biographie de quelques pharmaciens suisses, combien l'histoire de la pharmacie doit étudier les structures de la profession, le développement institutionnel, scientifique, mais aussi économique et social de la pharmacie.

### BIBLIOGRAFIA

- 
- (1) LEDERMANN, F. (1994): L'apport du biographique à une histoire sociale et culturelle de la pharmacie : l'exemple de la Biographie des pharmaciens suisses, *Rev. Hist. Pharm.*, 82: 205-210.
  - (2) FEHLMANN, S. (1997): *Deutsche Apotheker in der Schweiz*. Berne.
  - (3) HÄFLIGER, J.-A., in: THOMANN, J., HÄFLIGER, J.A. VERDA, A. (1943): *Festschrift zum 100. Geburtstag des Schweizerischen Apothekervereins*. Bâle. LEDERMANN, F. (1993): *Biographie des pharmaciens suisses*. Berne. LEON, L. (1984): *Apotheker-Exlibris im Schweizerischen Pharmaziehistorischen Museum*, *Kos* 1: 112-116. Tous les pharmaciens suisses dont il est question dans cet article sont mentionnés dans la *Biographie des pharmaciens suisses*.
  - (4) EBNÖTHER, R. et KELLER-REICHARD, H. (1992): *Bibliographie zur Schweizer Pharmaziegeschichte*. Zurich.
  - (5) FEHLMANN, H.-R. (éd.) (1988): *Zur Geschichte der Schweizerischen Apothekenwesens dargestellt an drei Orten Davos, Zürich und Basel*. Zurich.
  - (6) HÄFLIGER, J.-A. (1937-1938): *Das Apothekenwesen Basels*, *Basler Z. Gesch. Altertums*, 36-37.
  - (7) GAUTIER, L. (1903): *La médecine à Genève jusqu'à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle*. Genève.
  - (8) FLÜCKIGER, F.A. (1862): *Beiträge zur älteren Geschichte der Pharmazie in Bern*, *Schweiz. Z. Pharm.*
  - (9) LEDERMANN, F. (éd.), (1990): *Une profession au tournant : les pharmaciens suisses au XIX<sup>e</sup> siècle*. Zurich.
  - (10) FEHLMANN, H.-R. (1968): *Die Gründerzeit des Schweizerischen Apotheker-Vereins*, *Schweiz. Apoth. Ztg.* 106: 410-417.
  - (11) STOLL, C. (1991): *Apotheker und Gesetzgebung*. Zurich.
  - (12) LEDERMANN, F. (1993): *Biographie des pharmaciens suisses*. Berne.
  - (13) BOESCH, G. (1957): *Renward Cysat (1545-1614) Luzerner Staatsmann, Apotheker, Naturforscher und Schauspieldichter*, *Veröff. Int. Ges. Gesch. Pharm.*, NF, 10: 68-75.
  - (14) LEDERMANN, F. (1984): *Bibliographie des ouvrages suisses de pharmacopée*. Zurich.

- 
- (15) DUCOMMUN, F. (1959): *Pharmaciens d'autrefois*. Genève.
- (16) ZEROBIN, C. (1994): *Drei Berner Apotheker des 19. Jahrhunderts*. Bern.
- (17) LEDERMANN, F. (1984): *Bibliographie des ouvrages suisses de pharmacopée*. Zurich. BÜCHI, J. (1981-1986): *Die Entwicklung der Rezept- und Arzneimittelliteratur*, 3 vols. Zurich.
- (18) EIDENBENZ, E. (1918): *Geschichte der zürcherischen Pharmazie seit 1798*. Zurich.
- (19) RORDORF, H. (1927): *Über die Entwicklung der chemisch-pharmazeutischen Spezialitäten-Industrie in der Schweiz*. Wohlen.
- (20) HÄFLIGER, J.-A. (1946): *Geschichte der ersten hundert Jahre des Schweizerischen Apotheker-Vereins*. Bâle.
- (21) Cf. HÖRMANN, U. (1998): *Die akademische Ausbildung der Apotheker im Kanton Bern*. Berne. Ainsi que HÜGLI, H. (1973): *L'Ecole de Pharmacie de l'Université de Lausanne*. Lausanne.
- (22) JAROSCHINSKY, P. (1988): *Burkhard Reber 1848-1926. Ein Vorläufer der Schweizerischen Pharmaziegeschichte*. Stuttgart.

+Anal Real Acad. Farm. 2000, 66:

---

## **Una “*Farmacia Virtual*” en Internet**

H. CHAVEZ; P. SÁNCHEZ; C. PUELLES

*Dpto. de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas.- Facultad de Ciencias  
Químicas y Farmacéuticas.- Universidad de Chile.- Casilla 233.-  
Santiago de Chile.*

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido la creación, elaboración e instalación de una página Web de información farmacéutica de uso docente y servicio farmacéutico utilizando y aprovechando las capacidades de Internet.

La página creada se llama “Farmacia Virtual” y contiene diversos temas de interés: atención al público, búsquedas (en Internet) y algunas clases de la asignatura de Farmacia Privada.

Esta página se incorporó a la docencia siendo evaluada con muy buena aceptación de parte de los estudiantes de pregrado, profesionales de la salud y público en general.

**Palabras clave:** Educación farmacéutica.- Internet.- Páginas web.

### SUMMARY

#### **A “Virtual Pharmacy” in Internet**

The Purpose of this study has been to create and implement a Web page for teaching purposes and pharmaceutical service taking advantage of use of Internet's potentialities.

The created Web page is called "Virtual Pharmacy" and includes several interesting issues: customer's attention, search (in Internet) and teaching topics from the subject Private Pharmacy.

This page has become part of regular teaching and has been favourably accepted by undergraduate students, health professionals, and user in general.

**Key words:** Pharmacy education.- Internet.- Web pages

## INTRODUCCIÓN

El acceso a una gran cantidad de información y la difusión del uso de ordenadores conectados a Internet está produciendo un cambio importante en los estudiantes universitarios. En este sentido la enseñanza de Farmacia en nuestra Facultad está incorporando técnicas infocomunicacionales que motiven al alumno aprovechando su creciente conocimiento computacional.

En este trabajo se presenta la creación de una página Web de uso docente, que también sirve a la comunidad respondiendo sus consultas sobre medicamentos.

En la actualidad Internet es una red interconectada de redes de ordenadores que une a más de un millón de servidores en el mundo; esta gran red utiliza diferentes medios para comunicarse como cable coaxial, microondas, fibra óptica, satélites, líneas telefónicas, etc (1). Por lo tanto el alumno dispone de muchas formas de entrar en Internet. En la década de los noventa, Internet experimentó un crecimiento increíble en el número de usuarios. En octubre de 1993 había 2,2 millones de servidores conectados, y a fines de marzo de 1997 se estimó en 12,5 millones de servidores. Cada uno de esos servidores tiene la capacidad de conectar a millares de usuarios más. La investigación realizada por la organización *Nua Internet Surveys* estimó que en junio de 1998 había 122 millones de usuarios conectados a Internet en el mundo y en marzo del 2000, hay 304 millones de usuarios (2). En el caso de nuestro país, la historia no es muy diferente. La idea de crear una red nacional se concretó en 1986, en que dos empresas privadas fueron el motor fundamental. En 1978 se logró la primera conexión internacional. En 1990 la red dejó de ser exclusivamente académica abriéndose a nuevas posibilidades, es así que

se logró unir a quienes estuvieran interesados y concretar la conexión inicial de la Red Universitaria Nacional (REUNA) (3).

Así el Consejo de Rectores de las Universidades Chilenas aceptó la creación de esta corporación para que desarrollara y administrara este tipo de redes y la conexión a Internet. Entre 1992 y 1993 se conectaron todas las instituciones que formaban parte del consorcio Reuna y algunos privados. Pero fue en 1993 cuando apareció la página Web que la imagen de Internet cambió totalmente. Una página Web se define como cualquier documento que está escrito en formato de hipertexto, el que está constituido por una o muchas páginas que están relacionadas mediante hipernexos, las cuales están disponibles a través de World Wide Web. En ellas se pueden incorporar gráficos y vídeos que motivan más a los usuarios, con lo que se abrió un nuevo mercado, más amplio y más masivo. La red mundial ha permitido acceder a variada información de salud y de medicamentos. Por otra parte usando las herramientas de búsqueda más conocidas en Internet como Yahoo, Lycos o Altavista es posible tener acceso a muchos lugares relacionados, los cuales pueden ser tantos, que también constituye un problema al momento de iniciar la búsqueda (4). Pensamos que la página Web es una oportunidad de abrir una ventana al mundo sobre lo que significa el uso racional, responsable e informado de los medicamentos. Por lo tanto la página que hemos desarrollado cumple dos funciones: una docente y otra social. El empleo del lenguaje hipertexto hace muy fácil la exploración de escritos y además resulta bastante entretenido. La incorporación de imágenes en páginas Web es sencilla y la calidad de éstas suele ser superior a las impresiones en papel (dependiendo de la tarjeta gráfica).

El objetivo de este trabajo es la implementación de una página Web que sirva de apoyo docente a la asignatura de Farmacia Privada entregándole información útil al alumno en formato de hipertexto, aprovechando el uso de tecnología infocomunicacionales, que hagan más eficiente y entretenido el proceso de aprendizaje. Por otro lado este sitio puede prestar asesoría respondiendo consultas de medicamentos a profesionales de la salud y a público en general.

## METODOLOGÍA

Para crear la página Web docente, se recurrió a organizar un proceso en etapas que permitiera ir trabajando en forma simultánea dos aspectos básicos: diseño y contenido. Estas dos áreas son inseparables, ya que por un lado, de acuerdo a los contenidos seleccionados hay que ir acomodándose a un diseño tal que resulte entretenido y fácil de acceder a la información, y por otro lado el diseño debe ser compatible con el tipo de información que se entregue.

De acuerdo a lo anterior podemos enumerar las siguientes etapas.

- 1.- Selección de material bibliográfico y de páginas Web relacionadas para conocer la situación actual de la información farmacéutica en el campo de la Farmacia Privada. Para esto, se buscó en diversas referencias con el fin de indagar los intereses, motivaciones comunes y necesidades reales que tienen los Químicos Farmacéuticos en su desarrollo profesional (4), (5), (6), (7), (8), (9). Para apoyar este hecho se investigaron sitios Web similares en Internet.
- 2.- Recopilación de Software disponible para la creación y elaboración de páginas Web. Se eligieron aquellos que permiten una fácil elaboración de la página y un manejo simple a nivel de usuario, utilizando en nuestro caso Microsoft Word 96 y Microsoft FrontPage 98.
- 3.- Creación, programación computacional e instalación de la nueva página Web "Farmacia Virtual". A partir del material bibliográfico y software seleccionado, se inició la construcción de la página Web y su posterior instalación en un servidor universitario para ir incorporando los contenidos y revisando todos aquellos aspectos relacionados con el acceso: conectividad, tiempo de carga de la página, cargar imágenes, entre las principales.
- 4.- Marcha blanca del Web. En esta etapa se efectúa la validación de esta página, evaluando a través de una encuesta realizadas a alumnos de diferentes niveles de Química y Farmacia dos aspectos: diseño y contenido, en base a conceptos (malo, regular, bueno y muy bueno) y finalmente también permitió incorporar algunas sugerencias dadas por los alumnos.

Adicionalmente al haber incorporado un contador de visitas de dominio público, se obtuvo una serie de estadísticas de visita, entre las que destacamos: países visitantes, horarios, días, semanas y meses más visitados, tipos de sistemas operativos por la cual se hace la conexión, etc.

## RESULTADOS

La página “*Farmacia Virtual*” tiene la siguiente dirección Internet: <http://abello.dic.uchile.cl/~tduca4/farmacivirtua>.

Consta de tres secciones básicas en cada página:

1.- la *sección superior* presenta el Título del Web: “*Farmacia Virtual*”. El diseño del web consta del título destacado en color azul y blanco. Este título se mantiene constante en todas las páginas.

2.- La *sección lateral izquierda* corresponde al *índice*. En esta sección se encuentran indicados todos los temas que incluye la página web, cada uno como un botón:

**Página Principal:** esta es la primera página que se conecta cuando se ingresa al sitio web. Ella señala el objetivo general que el proyecto busca. Permite a los usuarios del Web conectarse a otros sitios de interés académico, como es el sitio Web de la Universidad de Chile y el de nuestra Facultad. En la parte final, la página consta de un contador estadístico de visitas. A través de este hipernexo se puede acceder a las estadísticas generales del web en cuanto a tipo de equipo que accede a la página, hora de visita, lugar de visita, browser utilizado en la visita entre otras.

**Atención al público:** presenta una página que nos conecta a un formulario de consultas en que los pacientes (usuarios), químicos farmacéuticos u otros profesionales de la salud pueden formular diversas consultas. La característica que debemos destacar es que esta información se escribe en el formulario y luego se envía vía Internet hacia el servidor. La respuesta se enviará a los usuarios vía correo electrónico, lo que permite su confidencialidad.

**Búsquedas:** vincula a páginas web con múltiples temas farmacéuticos.

**Clases:** materias de interés para el alumno de la asignatura de Farmacia Privada: enfermedades de la piel, afecciones del aparato respiratorio, uso de analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos, trastornos gastrointestinales, antibióticos y quimioterápicos, enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, asma), embarazo, consejos sobre el uso de medicamentos veterinarios, exámenes de laboratorio, forma de prescripción médica, recetario magistral, aspectos legales y administrativos (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16).

Cada uno de los temas está escrito como un *hipervínculo*, es decir, al acceder interactivamente a cada uno de ellos, inmediatamente lo conduce a la dirección elegida en la pantalla lateral derecha. En la parte final de esta página se puede acceder a hipervínculos que nos conectan a través del web a las direcciones de correo electrónico o *e-mail*.

3.- La tercera sección es la *sección central* en este sector se presentan las diversas páginas seleccionadas en la sección lateral izquierda.

A partir del diseño en tres secciones tenemos la gran ventaja de no perder de vista en ningún momento el índice lateral, por tanto, podemos retomar cada tema.

Computacionalmente la página web “Farmacia Virtual” fue diseñada con 13 directorios y 212 archivos, entre los que se cuentan archivos Html, de imágenes, sonidos y fondos. El conjunto de todos ellos ocupa un total de 2,69 Megabytes de memoria.

Los hipervínculos elegidos dentro de *Búsquedas* son diversos, entre ellos: dos bases de datos muy importantes para la consulta de medicamentos, marcas registradas, etc. Los sitios corresponden a: “*Pharminfonet*” y “*Drug Databases*” de la USP (United States Pharmacopeia). La información entregada, especialmente por el último incluye prácticamente todas las monografías farmacéuticas de medicamentos que se necesitan para una buena recomendación.

“*Dermatology Databases*” es una base de datos dermatológicos que complementa el sitio de enfermedades de la piel. Este presenta variados tópicos de tratamientos de enfermedades de la piel, pero también

incluye un extenso atlas dermatológico que permite observar diversas fotografías de enfermedades de la piel por orden alfabético. Este atlas virtual dispone de una alternativa de ampliación fotográfica de aclaración de determinada zona de la piel analizada. Es un sitio muy útil para clarificar una consulta directa de afecciones de la piel e indicar la recomendación más adecuada frente al caso que el paciente presente la duda y aconsejar la visita al médico dermatólogo para que indique el tratamiento farmacológico más adecuado.

“*Pharm Web – Pharmacy and the Internet*” es un sitio donde están incluidas diversas publicaciones internacionales de interés farmacéutico. Lo interesante que presenta este sitio es que se pueden publicar artículos farmacéuticos directamente con sólo enviar la información vía correo electrónico.

“*MedWeb: Pharmacy and Pharmacology*” proporciona información farmacéutica proveniente de diversas universidades norteamericanas, canadienses, australianas, francesas, entre otras, muy actualizada sobre los trabajos e investigaciones científicas realizadas en esos centros sobre diversos fármacos y sus diversas propiedades farmacológicas.

“*Pharmacy (Health Occupations)*”: es un sitio que permite la búsqueda de información farmacéutica a través del uso de monografías.

Lo interesante de este sitio es que permite la conexión a grupos de discusión sobre temas farmacéuticos.

“*Resources for the Professional and the Patient*”: presenta información en salud útil en la labor educativa farmacéutica que el Químico Farmacéutico puede disponer para entregar recomendaciones sobre enfermedades cardiovasculares, información sobre medicamentos, enfermedades crónicas, geriatría, etc., que permiten mejorar la calidad de vida de los pacientes.

“*Poweful Drugs without and prescription*”: temas sobre medicina alternativa, homeopatía, suplementos nutricionales, se destacan dentro de la información útil para entregar sin prescripción.

“*FIP World Wide List of Pharmacy Schools*”: informa de direcciones, teléfonos, fax, etc, de escuelas de Farmacia en distintas partes del mundo.

“*Pharmacy Web site links (Dot Pharmacy)*”: se encuentra información sobre organizaciones y compañías farmacéuticas, y otros sitios de interés.

“*Consult in Pharmacy*”: permite realizar consultas a otros profesionales farmacéuticos sobre diversos temas. La utilidad que presenta este sitio que permite mantener comunicación con profesionales de otras partes del mundo, compartir sus experiencias y establecer discusiones interesantes.

“*Pharmaceutical Representatives*”: muestra un listado de conexiones a páginas Web de compañías farmacéuticas de todo el mundo, conocer sus productos, investigaciones, etc.

“*Pharmaceutical Links*” tal como describe el título de este web, permite al farmacéutico buscar información de su interés a través de una serie de hipervínculos farmacéuticos disponibles.

“*Farmac*” sitio web diseñado en España, con información interesante sobre Atención farmacéutica elaborada por el Colegio de Farmacéuticos de Madrid. Se destaca en este web la posibilidad de realizar “download”, es decir, bajar un programa computacional de gestión en farmacias.

“*Farmaweb.com*” es un sitio que entrega información al profesional similar a webs anteriores pero la diferencia que presenta es incluir una alternativa de foros on-line con participación de farmacéuticos en diversos temas y direcciones de centros de medicamentos de España.

“*The Virtual Pharmacy Center*” es considerado uno de los mejores webs disponibles en Internet sobre información científica, farmacológica, bioquímica, farmacéutica, entre otras. Por lo extenso de la información que entrega, puede llamarse propiamente “un centro de información virtual” no sólo para el farmacéutico, sino para todos los investigadores y profesionales de la salud.

“*Medweb Electronic Publication*” es un sitio web que presenta numerosas publicaciones y revistas de Farmacia y Farmacología

actualizadas que dispone el farmacéutico para renovar sus conocimiento desde esta página web.

“*Consult your Pharmacist*” es un web de una publicación norteamericana orientada a los farmacéuticos sobre el uso correcto de medicamentos tanto prescritos como los OTC en terapias contra diversas enfermedades; Laboratorios farmacéuticos chilenos: presenta los webs de los laboratorios farmacéuticos: *Chile, Saval y Andrómaco*, con sus productos, información científica y otros sitios de interés.

“*Datamed*” sitio web que entrega la información de medicamentos comercializados en Chile. Permite búsquedas por marcas registradas, acción farmacológica, principio activo, entre otras. Sitio interesante y útil que los Químicos Farmacéuticos pueden disponer a través de este web.

“*Manual de primeros auxilios*” entrega información de utilidad práctica de primeros auxilios que puede ser ,muy interesante de saber en casos de real emergencia vital.

“*CNN Health*” es la página web de la cadena televisiva norteamericana CNN en sus versiones en inglés y español. Presenta mucha información periodística de avances científicos en salud, nuevos medicamentos, nuevas terapias, etc., y conecta a muchos otros webs a través de sus propios buscadores en Internet.

## CONCLUSIONES

La página Web “Farmacia Virtual” puede ser un medio eficiente de actualización de conocimiento para profesiones Químico Farmacéuticos.

La página Web “Farmacia Virtual” puede constituirse en un nuevo medio de comunicación entre los usuarios (alumnos, pacientes u otros profesionales de la salud) y el Químico Farmacéutico, mejorando la imagen profesional.

La “Farmacia Virtual” puede constituirse en una nueva modalidad de docencia, a partir de metodologías infocomunicacionales, aprovechando la propia iniciativa y autoaprendizaje el alumno en investigación y búsqueda de información farmacéutica.

Esta página Web cumple con los objetivos planteados respecto a los contenidos abarcando la mayoría de los temas farmacéuticos de consulta frecuente de Farmacia Privada (en Chile).

La página cumple los objetivos planteados respecto al diseño logrando un equilibrio sensorial que resulta importante al momento de visitarla y conservar la atención del alumno por la búsqueda intuitiva de información farmacéutica de interés.

Los alumnos señalan que la Página Web es una idea excelente, creativa, atractiva, novedosa, rápida y fácil que permitirá la obtención de conocimientos farmacéuticos necesarios para la formación del Químico Farmacéutico como la actualización de conocimientos de los futuros profesionales que engrosarán e integrarán esta área laboral, permitiendo ser un medio más de comunicación destacando aún más nuestra imagen profesional.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) SISIB, UNIVERSIDAD DE CHILE (1986) Internet, Guía práctica para el usuario. Cap. 1, 15 Ed. Universitaria, S.A., Santiago de Chile.
- (2) <http://www.tabnet.com/charts.htm>. (Consultada 25 de mayo de 2000).
- (3) BOIZARD, A.; PÉRES, M. (1996) Internet en acción. Cap. 10, 202. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de Chile Ltda.. Santiago de Chile.
- (4) CHÁVEZ, H.; SÁNCHEZ, P. Y THIELEMANN, A.M. (1998) *Acta Farm. Bonaerense* 17 (4): 301-312.
- (5) VILLEGAS, G.; BRIERA, J.; DANHIER, A. (1984) Utilización de medicamentos dispensados en el gran Santiago. *Rev. Med. Chile* 112: 185-191.
- (6) DINARELLO, C.A.; WOLFF, S.M. (1978) Pathogenesis of fever un man. *N. Engl. J. Med.* 298: 607.
- (7) HORTON, R.; CONMELL, J.; DELAMOTHE, T.; WALLACE, M.; BINGHAM, C.; ASHRAF, H. (1998) *Lancet* 351 (supl. I): 1-17.
- (8) MARRA, C.; LYND, L.; MCKERROW, R.; CARLETON, B. 81996) *Pharmacotherapy* 16 (4): 537-546.
- (9) BOURNE, D.; HOGKINSON, P.; MCLEAN, D. (1995) *Am. J. Pharm. Educ.* 59: 401-402.
- (10) HARDMAN, J.; GOODMAN, A. ET AL. (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica 9ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

- (11) BERLOW, R. (DIRECTOR EDITORIAL) (1994) El Manuel Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 9ª edición. Ed. McGraw Hill Interamericana. México.
- (12) JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. (1981) Manuel de Microbiología Médica. 9ª edición. Ed. El Manual Moderno S.A. México.
- (13) SHAPIRO, S.S. (1988) *Drugs* 36: 475-490.
- (14) KIGLIOLA, P.A.; RUBIN, J. (1991) Cosmiatría II, 2ª edición, B.A., Argentina, A.P. Americana de Publicaciones S.A.
- (15) <http://vm.cfsan.fda.gov/~ird/fdinter.html> (consultada: 25 de mayo de 2000)
- (16) FITZPATRICK, T. ET AL. (1994) Atlas de Dermatología clínica. Ed. McGraw Hill Interamericana 2ª edición. México.



Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

**Artículos**  
**originales**

**Receptores nicotínicos neurales: interacción con  
receptores purinérgicos**

MIGUEL DÍAZ-HERNÁNDEZ, JAVIER GUALIX, ROSA GÓMEZ-  
VILLAFUERTES, ENRIQUE CASTRO, JESÚS PINTOR Y  
M<sup>a</sup> TERESA MIRAS-PORTUGAL.

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad  
Complutense Madrid, 28040 Madrid*

RESUMEN

La nicotina es un alcaloide volátil, cuyos efectos farmacológicos y toxicológicos se deben a que interacciona con los receptores ionotrópicos de acetilcolina, que por esta razón reciben el nombre de receptores nicotínicos.

La caracterización de los receptores nicotínicos se vio facilitada por su gran abundancia en las sinapsis colinérgicas del órgano eléctrico del pez torpedo, que son análogas a las de la unión neuromuscular de mamíferos. Estos receptores y sus homólogos neurales son pentaméricos. El de la unión neuromuscular es el más complejo de todos y consta de cinco subunidades ( $2\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta$ ). Existen al menos 9 subunidades  $\alpha$  y 4 subunidades  $\beta$  diferentes, que dan lugar a múltiples combinaciones con farmacología y distribución específica en el sistema nervioso.

Los receptores neurales pueden clasificarse en dos grandes grupos, en primer lugar los que son inhibidos por la  $\alpha$ -bungarotoxina, que están constituidos exclusivamente por subunidades  $\alpha 7$  ó  $\alpha 8$ , pueden ser homoméricos ( $5\alpha 7$  ó  $5\alpha 8$ ). El segundo grupo de los receptores nicotínicos neurales lo constituyen aquellos que no son sensibles a la  $\alpha$ -bungarotoxina, pero que son estimulados por la epibatidina. Esta sustancia es 100 veces más potente que la morfina para inducir analgesia, lo que supone

nuevas perspectivas en el tratamiento del dolor. Estos receptores tienen una combinación variable, aunque la presencia de subunidades  $\alpha 4/\beta 2$ , es muy frecuente.

Los dos tipos de receptores neurales al activarse permiten el paso de iones  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ , que despolarizan la membrana y permiten estimular la secreción. Los receptores nicotínicos están ampliamente distribuidos en todas las áreas cerebrales con innervación colinérgica y su localización en las terminales nerviosas es preferentemente presináptica. Pueden potenciar y facilitar la propia secreción de acetilcolina, o la de glutamato y noradrenalina. La nicotina favorece también la liberación de dopamina en el estriado y uno de los mecanismos para explicar la adicción al tabaco está basado en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens al inhalar la nicotina de los cigarrillos. Esta amplia función potenciadora de la secreción, llevada a cabo por la acetilcolina, explicaría en cierto modo las graves consecuencias que se derivan de la pérdida de neuronas colinérgicas, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer.

La presencia de receptores nicotínicos en terminales neurales aisladas puede ser estudiada por vídeo imagen, midiendo la entrada de calcio con una sonda fluorescente. En las mismas terminales se puede demostrar la presencia de receptores ionotrópicos para ATP, que mediante estudios inmunohistoquímicos, demuestran contener el subtipo P2X<sub>3</sub>. El ATP y otros nucleótidos, junto con la epibatidina y la propia nicotina son capaces de inducir la liberación de acetilcolina de sinaptosomas de cerebro medio de rata. Estos resultados demuestran que la acetilcolina y el ATP, que están coalmacenados en vesículas de secreción, tienen también autorreceptores ionotrópicos funcionales en la misma terminal sináptica. El estudio de sus interacciones nos dará una visión más completa del funcionamiento sináptico y de sus disfunciones.

**Palabras Clave:** receptores nicotínicos, secreción, terminales presinápticas, receptores nucleotídicos, tabaco, adicción, Alzheimer, neurotransmisión colinérgica.

#### SUMMARY

**Nicotine is a volatile alkaloid that interacts with the ionotropic acetylcholine receptors, thus named nicotinic receptors.**

The nicotinic receptors are very abundant at the Torpedo electric organ cholinergic synapses, allowing their characterisation. These receptors are analogous to the mammalian neuromuscular junction, they are pentameric and contain five subunits, two  $\alpha$ , and one of each other ( $2\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ ). The protein family of  $\alpha$  subunits contain 9 members, and that of  $\beta$  subunits four members. Their combinations originate a large number of different receptors with specific distribution in the nervous system.

Neural nicotinic receptors can be classified in two main groups, the first one are receptors inhibited by  $\alpha$ -bungarotoxin and containing exclusively the  $\alpha 7$  and  $\alpha 8$  subunits, originating homomeric receptors ( $5\alpha 7$  or  $5\alpha 8$ ). The second group of neural nicotinic receptors is not sensitive to  $\alpha$ -bungarotoxin, but they are activated by

epibatidine. They contain a larger variety of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and the combination  $\alpha 4/\beta 2$  is very frequent.

Both neural nicotinic receptors when stimulated allow the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  entrance, originating a membrane depolarisation and subsequently the exocytotic release of neurotransmitters. Nicotinic receptors are widely distributed in mammalian brain, and their localisation in nerve terminals is mainly presynaptic. There, they facilitate, potentiate or induce the neurotransmitter release of the acetylcholine itself, or other neurotransmitters, such as glutamate, noradrenaline or GABA. Special mention deserves the facilitation of dopamine release from striatum/nucleus accumbens that provide a plausible explanation on tobacco smoking addiction. This wide effect on secretion potentiation carried out by acetylcholine via nicotinic receptors could explain the fatal consequences derived from the cholinergic neurones lost, as it is the case in Alzheimer disease.

The presence of nicotinic receptors in isolated nerve terminals was studied by microfluorescence coupled to video imaging, measuring the  $\text{Ca}^{2+}$  entrance with a fluorescent dye, as it was also done for the ATP and ApnA ionotropic receptors. At the same terminals by immunohistochemical studies, the presence of the P2X<sub>3</sub>, subtype of ATP receptors was shown. ATP and Ap<sub>5</sub>A were able to induce the release of acetylcholine from rat midbrain synaptic terminals. These results corroborate the idea of a certainly complex cross-talk between nucleotide and nicotinic receptors at the same presynaptic terminals, with relevant consequences for neural functioning and future pharmacology.

## INTRODUCCIÓN

Era difícil de imaginar que las hojas traídas por Colón del Nuevo Mundo, conocidas como “tabaco”, y con los mismos usos que en la actualidad, alcanzarían tan amplia difusión y consumo. En la primera mitad del siglo XVI su cultivo se extiende por los países del Sur de Europa, llegando las semillas de tabaco a Francia, a la corte de la reina regente Catalina de Médicis a través de Jean Nicot, a la sazón embajador en Lisboa, y origen del nombre de *Nicotiana tabacum* dado a la planta.

Los efectos del tabaco despiertan el interés por conocer sus principios activos, y es a finales de este mismo siglo XVI, cuando se obtienen y emplean, extractos crudos de la planta. No es de extrañar que sea uno de sus principales componentes, la nicotina, purificado en fecha tan temprana como 1828. Este alcaloide, uno de los pocos que es líquido y fácilmente volátil demuestra ser un poderoso neurotóxico. La fórmula molecular se establece en 1843, y la síntesis química en 1904, pero serían

necesarios todavía muchos años para comprender su mecanismo de acción, pues la acetilcolina todavía no se había descubierto.

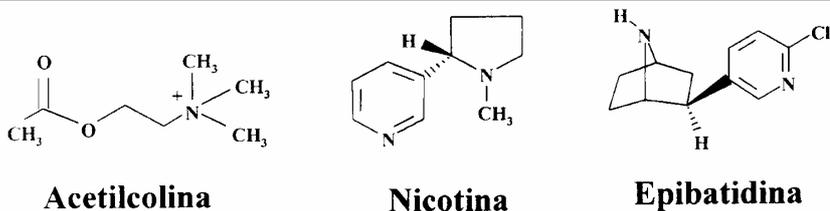
La historia de la nicotina ha corrido pareja a los grandes descubrimientos en el campo de la neurotransmisión durante los últimos ochenta años. El reciente descubrimiento de nuevos receptores sensibles a esta substancia dentro del sistema nervioso central ha puesto a la nicotina en el punto de mira de nuevas aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el mal de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

Tal vez ahora, después de cinco siglos, y sobre la base de las características de los receptores nicotínicos cerebrales se pueda llegar a comprender porque resulta tan difícil dejar de fumar.

#### ACETILCOLINA Y SUS RECEPTORES.

La existencia de un mediador químico, que se libera al medio al estimular el nervio vago y capaz de disminuir el latido cardiaco fue postulada por el fisiólogo alemán Otto Loewi en 1921. Esta sustancia fue caracterizada químicamente en 1929 y se la denomina acetilcolina, pues su estructura química resulta ser de gran simplicidad, un éster del ácido acético y la colina (figura 1). Se inicia aquí, la gran aventura científica de la señalización química de una célula a otra y del descubrimiento de los neurotransmisores. Los efectos de la nicotina se deben a que pueden reproducir, pero con mucha mas intensidad y duración las acciones del neurotransmisor acetilcolina, sobre algunos de sus receptores específicos.

Figura 1.- Estructura de la acetilcolina, nicotina y epibatidina.



La caracterización de dos grandes grupos de receptores de acetilcolina se realiza tempranamente gracias a la existencia de dos agonistas diferenciales, la nicotina que es específica de los receptores colinérgicos nicotínicos y la muscarina, aislada de la *Amanita muscaria*, que es específica de los receptores colinérgicos muscarínicos (Para revisión ver: Siegel y col 1999).

Los receptores muscarínicos de acetilcolina forman una familia de receptores de membrana de los que existen cinco subtipos, M1, M2, M3, M4 y M5, todos ellos son metabotrópicos, tienen siete hélices transmembranares y están acoplados a diferentes proteínas G. Cada uno de ellos tiene su propia farmacología y distribución, siendo capaces de modular respuestas tempranas y tardías en la células en que se encuentran localizados. Pero la descripción de las funciones y mecanismos de señalización de los receptores muscarínicos, así como su farmacología se escapan del objetivo de este artículo, en el que nos centraremos en los receptores nicotínicos.

Los receptores nicotínicos de la acetilcolina fueron los primeros receptores ionotrópicos en ser purificados y clonados. Estos receptores también conocidos como canales operados por ligando, se abren al unirse el neurotransmisor, a diferencia de los que se abren como consecuencia de un cambio en el voltaje de la membrana celular, conocidos como canales operados por voltaje. Estos canales operados por ligando hacen entrar gran cantidad de iones y cambian el potencial de la membrana rápidamente, llevando a una inmediata respuesta celular, son los que se denominan neurotransmisores rápidos, para contraponerlos a los que actúan a través de proteínas G, también denominados metabotrópicos, ó lentos.

La caracterización de los receptores nicotínicos contó con la ayuda del pez torpedo, *Torpedo marmorata*, por la gran abundancia de receptores que tiene en la placa motora de su órgano eléctrico. Estos receptores resultaron ser equivalentes de los receptores nicotínicos presentes en la unión neuromuscular de todos los vertebrados, incluido el ser humano. La acetilcolina al unirse a este receptor, permite el paso de gran cantidad de iones  $\text{Na}^+$  y un poco de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando una rápida despolarización de la membrana plasmática.

En la unión neuromuscular, los receptores nicotínicos están constituidos por cinco subunidades: dos  $\alpha$ 1, una  $\beta$ 1, una  $\gamma$  y una  $\delta$  ( $2\alpha$ 1, $\beta$ 1, $\gamma$ , $\delta$ ). Cada una de estas subunidades son de hecho familias compuestas por varias proteínas con alto nivel de homología, así de las  $\alpha$  se han clonado nueve tipos diferentes ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 9), de las  $\beta$  cuatro ( $\beta$ 1- $\beta$ 4), y una respectivamente de las  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Cada una de estas subunidades tiene una estructura con cuatro hélices transmembranares. Los sitios de unión a la acetilcolina se encuentran en las subunidades  $\alpha$ , que tienen dos residuos de cisteína próximos entre si y necesarios para el reconocimiento del agonista. El resto de las subunidades carece de estos elementos y no puede unir la acetilcolina (figura 2). La función de cada uno de los aminoácidos en las distintas subunidades ha sido estudiada mediante mutagénesis dirigida y realizada en gran medida por el grupo de Jean Pierre Changeux ( LeNovere y Changeux 1995).

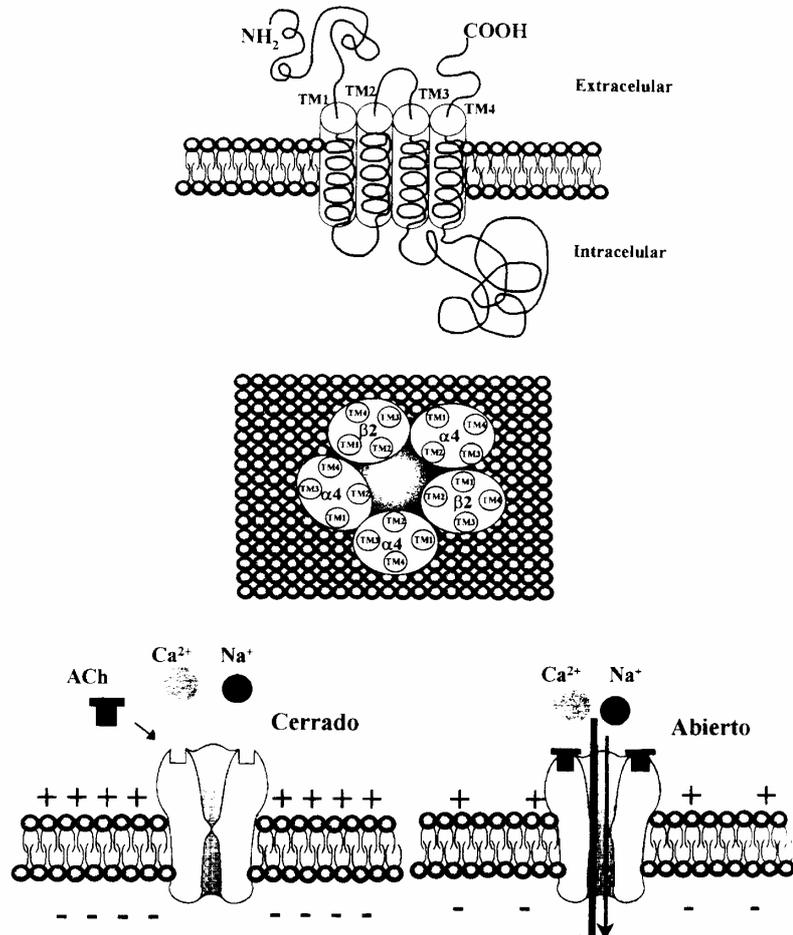


Figura 2.- Representación del receptor nicotínico.

Parte superior, estructura general de todas las subunidades, conteniendo cuatro hélices transmembranaras

Parte media, pentamero, conteniendo cinco subunidades. La hélice dos, TM2, es la que forma parte del poro del canal en todas las subunidades. Esta representado un receptor nicotínico neural  $\alpha 4/\beta 2$

Parte inferior, receptor cerrado/ receptor abierto. La union del efector, acetilcolina ó nicotina produce la apertura del canal y la entrada de  $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+$ , que producen la despolarizacion inicial de la membrana plasmatica.

La combinación de subunidades puede originar múltiples receptores con propiedades diferentes, pero la cuestión aquí es conocer cuales de estas combinaciones son mas frecuentes en el sistema nervioso central y cual es su localización precisa. Esto permitirá conocer el alcance de sus disfunciones y sus posibilidades terapéuticas.

#### DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS COLINÉRGICAS EN CEREBRO.

Antes de describir la funcionalidad de los receptores nicotínicos en cerebro es necesario reseñar brevemente la distribución de las neuronas colinérgicas. Los primeros mapas de distribución cerebral se obtuvieron mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos contra el enzima de degradación, la acetilcolinesterasa, que resultaron muy poco fiables por la amplia y poco específica distribución de este enzima. La utilización de anticuerpos contra el enzima de síntesis, la colina acetiltransferasa, ha permitido visualizar con claridad la organización de los ejes colinérgicos del cerebro. Recientemente el empleo de anticuerpos contra el transportador vesicular de acetilcolina, ha permitido una mejor definición de las terminales sinápticas donde la acetilcolina es el neurotransmisor. Los estudios de hibridación *in situ* con sondas para los ARNm del enzima de síntesis, ha permitido definir con una mayor claridad los cuerpos neurales, de este modo se dispone hoy en día de un preciso mapa colinérgico cerebral (figura 3) (Perry y col. 1999)

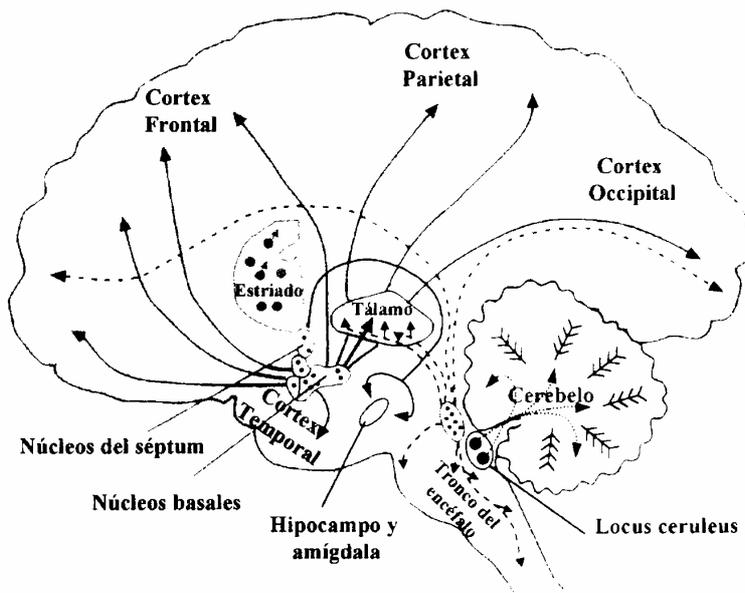
Figura 3.- Distribución de neuronas colinérgicas en cerebro.

Se pueden observar las neuronas de axones cortos fundamentalmente en el estriado y las vías colinérgicas de áxones largos y grandes proyecciones (modificado de Perry y col 1999).

a.- La vía colinérgica más prominente tiene los cuerpos neurales en zonas de los núcleos basales y el septum, y sus prolongaciones axónicas van al tálamo, otros núcleos del cerebro anterior, hipocampo y amígdala, para finalmente inervar el cortex frontal, parietal, occipital y temporal.

b.- La vía colinérgica que sale del tronco del encéfalo de los núcleos pontinos, proyecta sus axones al tálamo, habénula y también al cortex pero en menor medida.

c.- La vía colinérgica que sale de la zona próxima al locus ceruleus inerva el cerebelo.



La distribución y morfología de las neuronas colinérgicas es muy variada, las que tienen axones cortos se pueden considerar como interneuronas, son muy abundantes en el estriado donde establecen una estrecha relación funcional con las neuronas dopaminérgicas, cuyas terminales son muy abundantes en esta zona. Los núcleos de los pares craneales tienen también abundantes interneuronas colinérgicas, lo mismo

que toda la medula espinal. Otras interneuronas colinérgicas se encuentran en la corteza cerebral de los roedores, pero no tienen su equivalente en primates.

Las vías cerebrales colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa que las aminérgicas, y no siempre sus cuerpos celulares se corresponden con núcleos definidos. Destacaremos en primer lugar la vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se extienden por el septum, la banda diagonal de Broca, el pallidum ventral y sobre todo el núcleo basal de Meynert. Estas neuronas extienden sus axones hasta el bulbo olfativo, el cortex la amígdala y el hipocampo, quedando toda la vía del sistema de recompensa cerebral bajo su influencia. Una disminución de la funcionalidad de esta vía parece ser el origen de disfunciones cerebrales, como el Alzheimer, la demencia asociada con aparición de cuerpos de Lewy, e incluso alguna variante de Parkinson. Es de destacar que el núcleo basal de Meynert, que consta de unas 200.000 neuronas, a cada lado del cerebro del individuo sano, suele perder hasta un 90% de sus neuronas en enfermos de Alzheimer.

Una segunda vía colinérgica tiene sus cuerpos neurales localizados más caudalmente, en la zona del mesencéfalo y del núcleo tegmental lateral, en el suelo del cuarto ventrículo. Los axones de este sistema inervan el tálamo, hipotálamo, prácticamente todos los núcleos del cerebro medio, la habénula etc. Su relevancia en enfermedades neurodegenerativas es todavía discutida.

Finalmente, el núcleo vestibular del tronco del encéfalo, envía inervación colinérgica al cerebelo, su importancia en el aprendizaje y control del movimiento esta por definir.

#### TIPOS Y FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES NICOTÍNICOS PRESENTES EN CEREBRO.

Los receptores ionotrópicos de la acetilcolina presentes en cerebro son más sencillos que los de la unión neuromuscular, y están constituidos solamente por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Esta sencillez es solo aparente pues hay hasta siete subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$  diferentes que pueden formar múltiples

combinaciones. En la tabla 1 se indican las combinaciones de subunidades mas frecuentes en los receptores nicotínicos cerebrales y sus propiedades farmacológicas (Deneris y col. 1991).

TABLA 1  
*Características de los receptores nicotínicos*

Nomenclatura	Músculo	Neural	
	(sensible a $\alpha$ -bungarotoxina)	(sensible a $\alpha$ -bungarotoxina)	(no (sensible a $\alpha$ -bungarotoxina)
Agonistas	Ach, Nicotina	ACh, Colina, Nicotina	Ach, Nicotina, Epibatidina
Antagonistas selectivos	$\alpha$ -bungarotoxina (+)-tubocuramina	$\alpha$ -bungarotoxina metilcaconitina	Dihidro- $\beta$ -eritroidina Hexametonio* Mecamilamina*
Efecto	Internalización de cationes ( $P_{Ca}/P_{Na}$ 0.2-1)	Internalización de cationes ( $P_{Ca}/P_{Na}$ 6-20)	Internalización de cationes ( $P_{Ca}/P_{Na}$ 0.5-6)
Información estructural subunidades	$\alpha$ 1, $\beta$ 1, $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$	$\alpha$ 7, $\alpha$ 8	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 3, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\alpha$ 6, $\beta$ 2, $\beta$ 3, $\beta$ 4
Receptores purificados, o identificados <i>in vivo</i>	$\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ $\delta$ (embrionario) $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\epsilon$ $\delta$ (adulto)	$\alpha$ 7 y $\alpha$ 8 homopentaméricos $\alpha$ 7/ $\alpha$ 8 heteropentaméricos	$\alpha$ 3 $\beta$ 4, $\alpha$ 3 $\beta$ 4 $\alpha$ 5 (sinapsis del ganglio autónomo y SNC) $\alpha$ 4 $\beta$ 2, $\alpha$ 4 $\beta$ 2 $\alpha$ 5 (SNC y ganglio sensorial) $\alpha$ 3 $\beta$ 2 $\beta$ 4 $\beta$ 3, $\alpha$ 3 $\beta$ 2 $\beta$ 4 $\alpha$ 5 (Cerebelo)
Receptor más abundante		$\alpha$ 7 homopentamérico, presináptico	$\alpha$ 4 $\beta$ 2 presináptico

Modificado de T.I.P.S. 1999. Receptor & ion channel nomenclature supplement

(\*) = Bloquean el canal.

Existen dos grandes grupos ó tipos de receptores neurales, que se definen en base a la capacidad inhibitoria del veneno de la cobra, *Bulgarus multicinthus*, la  $\alpha$  bungarotoxina, y la capacidad agonista de la epibatidina, poderoso neurotóxico aislado de la piel de la rana ecuatoriana *Epidedobates tricolor*. La epibatidina mantiene cierta semejanza

estructural con la nicotina, como puede observarse en la figura 1, es además notorio destacar que es uno de los pocos productos naturales que contiene un átomo de cloro en su estructura.

El primer gran grupo de los receptores neurales está constituido exclusivamente por subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ , que son los únicos que pueden ser homopentámeros ( $5\alpha 7$  y  $5\alpha 8$ ) y se reconocen por ser inhibidos por la  $\alpha$ -bungarotoxina y no ser susceptibles de activación por epibatidina. Los receptores del tipo  $5\alpha 7$ , son los más abundantes y su presencia ha sido descrita en sistema nervioso periférico en ganglios simpáticos y parasimpáticos, y lamina X de la medula espinal. En el sistema nervioso central este tipo de receptores tiene una amplia distribución, encontrándose en todos los lugares donde ha sido estudiado: las interneuronas del estriado, la vía del cerebro medio/tálamo/estriado/núcleo accumbens, núcleo geniculado lateral etc. Recientemente se ha descrito su presencia en el lóbulo temporal e hipocampo, cortex prefrontal etc. En muchos de estos modelos se ha conseguido demostrar que tienen una localización presináptica. Esta localización junto con el dato de que su permeabilidad a  $Ca^{2+}$ , que es la mayor de todos los receptores nicotínicos, puede explicar su función facilitando ó induciendo la propia secreción, o la secreción de diferentes transmisores. Algunos ejemplos son el incremento de la liberación de acetilcolina en los ganglios simpáticos y parasimpáticos, y algunas áreas del cortex cerebral y del cerebelo. El incremento en la liberación de glutamato también ha sido demostrado en una serie de núcleos, como el de la habénula, tálamo, núcleo geniculado lateral, bulbo olfativo etc. Los receptores  $\alpha 7$  presinápticos pueden igualmente controlar a nivel presináptico la liberación de noradrenalina en muchas áreas del cerebro medio (McDermott y col. 1999; Meir y col. 1999).

El segundo gran grupo de receptores neurales es insensible a la inhibición por  $\alpha$ -bungarotoxina y activado por epibatidina. Es de hecho un grupo muy heterogéneo de receptores donde pueden intervenir las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ ; y las subunidades  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ . Entre las combinaciones más abundantes se encuentran  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 4\beta 2$ . La subunidad  $\alpha 4$  está ampliamente distribuida por el estriado, donde ejerce un poderoso control de la secreción de dopamina. Una posible explicación

del poder adictivo de la nicotina reside en su capacidad para liberar dopamina en el núcleo accumbens y otras zonas de la vía de recompensa cerebral. El incremento de la liberación de GABA de las interneuronas del estriado y de otras del tálamo y cerebro medio, así como la liberación de noradrenalina del locus coeruleus están bajo el control de los receptores presinápticos nicotínicos, fundamentalmente conteniendo las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  (Wonnacott 1997, Gallardo y Leslie 1998; McDermott y col 1999).

La capacidad de la nicotina de inducir la secreción generalizada de casi todos los neurotransmisores ha llevado a su utilización en pacientes de Alzheimer, observándose que incrementa su capacidad de atención y comportamiento inmediato, pero no tiene efecto sobre la memoria perdida. Aproximaciones similares y búsqueda de agonistas nicotínicos apropiados se está realizando en los distintos tipos de enfermedad de Parkinson y en la demencia con presencia de cuerpos de Lewy (Perry y col 1999).

Las técnicas de biología molecular han permitido generar ratones mutantes en donde faltan una o dos de las subunidades de los receptores nicotínicos. Estos ratones son viables, se reproducen y suplen unas subunidades por otras con gran facilidad y plasticidad. Los ratones con bloqueo del gen que codifica la subunidad  $\alpha 4$ , muestra una reducida capacidad de unión de epibatidina a cortes de cerebro y la capacidad antinociceptiva de la nicotina y de la epibatidina muy reducida. Esto confirma la potencialidad de los receptores nicotínicos que contienen esta subunidad como posibles dianas farmacológicas en el tratamiento del dolor y la búsqueda de agonistas específicos y poco tóxicos (Marubio y col 1999).

Otro aspecto poco resaltado del receptor nicotínico  $\alpha 4\beta 2$ , es su sensibilidad a los anestésicos generales volátiles que interaccionan con este receptor con mucha mas afinidad que con el receptor de GABA, el cual era considerado como la principal diana farmacológica de estos compuestos. Estrechamente relacionados con el sitio de unión de los anestésicos volátiles están los sitios de unión de los neuroesteroides, poderosos tranquilizantes naturales y cuya farmacología esta por desarrollar (Perry y col 1999).

## INTERACCIONES DEL SISTEMA PURINÉRGICO Y COLINÉRGICO A NIVEL PRESINÁPTICO.

La acetilcolina lo mismo que las aminas neurotransmisoras (noradrenalina, dopamina, serotonina e histamina) están coalmacenadas en vesículas de secreción con ATP y otros nucleótidos y dinucleótidos y son liberadas al medio extracelular previa estimulación y despolarización de las terminales sinápticas (Richardson y Brown, 1987, Rodríguez del Castillo y col 1988; Pintor y col 1991 y 1992).

El conocimiento de los receptores nicotínicos, es muy amplio, debido a que han sido objeto de estudio durante muchos años. No es este el caso de los receptores de nucleótidos, los cuales han sido los últimos en aparecer en la escena de la neurotransmisión, por la dificultad de su estudio. Estos receptores denominados purinérgicos P2, tienen dos grandes familias, la de los receptores P2Y, que son metabotrópicos y la de los P2X que son ionotrópicos (para revisión ver. Ralevic y Burnstock, 1998). En este trabajo presentaremos solamente datos de las interacciones de receptores P2X y P4, que son respectivamente ionotrópicos de ATP y de Ap<sub>n</sub>A, con el sistema colinérgico.

En nuestro laboratorio tenemos amplia experiencia en los receptores de nucleótidos y dinucleótidos que se encuentran localizados a nivel presináptico, en donde hemos caracterizado la presencia de receptores ionotrópicos de ATP, denominados P2X y de receptores ionotrópicos específicos para diadenosina polifosfatos denominados P4 (Pintor y Miras-Portugal 1995, Miras-Portugal 1997, Miras-Portugal y col 1999). Trabajos de otros autores han demostrado que los receptores de nucleótidos pueden influenciar la liberación de neurotransmisores y concretamente la liberación de glutamato de las sinapsis de neuronas sensitivas, mediada a través de receptores P2X (Gu y Macdermott, 1997).

La pregunta que nos planteamos conociendo los datos anteriormente citados, era saber si los receptores de ATP presinápticos podían inducir la secreción de acetilcolina y si ambos receptores, P2X y nicotínicos, coexistían en las mismas terminales.

Los estudios se realizaron en terminales sinápticas purificadas de cerebro medio de rata, que son muy abundantes en terminales

colinérgicas. En estas mismas terminales fue donde por primera vez se demostró la presencia de receptores de ATP -P2X- y de Ap<sub>n</sub>A -P4- funcionales (Pintor y Miras-Portugal 1995).

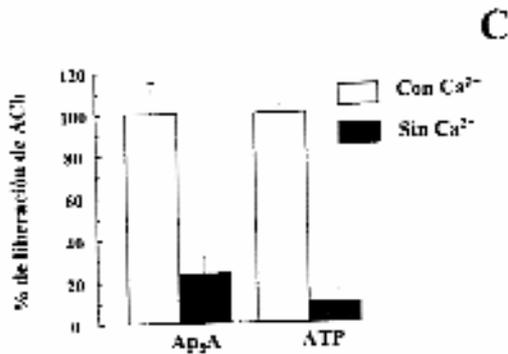
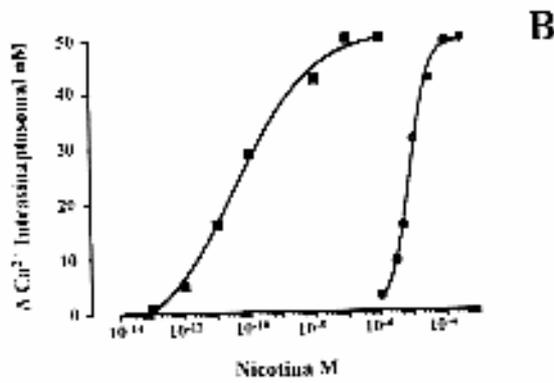
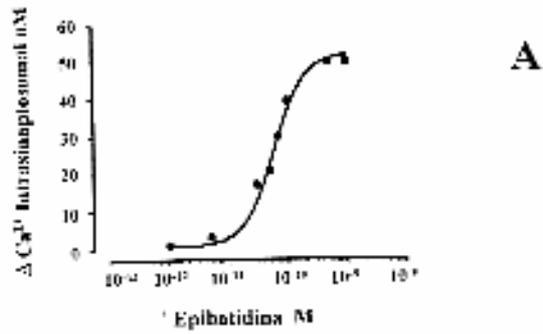
En la figura 4-a se observa como las terminales de cerebro medio de rata responden a nicotina con una poderosa entrada de calcio del medio extrasinaptosomal. La respuesta a nicotina se ve ampliamente influenciada por la presencia en el medio de otros efectores, como la propia acetilcolina liberada durante la preparación de los sinaptosomas. La eliminación de acetilcolina con acetilcolinesterasa, desplaza la curva dosis respuesta a la izquierda y aparece el sitio de muy alta afinidad con valor de EC<sub>50</sub> de 38,6 pM. ( $3,8 \times 10^{-11}$  M!). Esta elevada afinidad permite explicar por que la minúscula cantidad de nicotina inhalada al fumar tiene un efecto potencial en la secreción a nivel presináptico y los fumadores se

Figura 4.- Curvas de dosis respuesta de nicotina y epibatidina en terminales sinápticas de cerebro medio de rata. Secreción de acetilcolina inducida por ATP y diadenosina polifosfatos.

**a.-** Curva de dosis respuesta para la (+) Epibatidina en terminales sinápticas de cerebro medio de rata. Los sinaptosomas fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Pintor y Miras Portugal (1995). Se muestra los incrementos en el Ca<sup>2+</sup> intrasinaptosomal producidos al estimular los sinaptosomas con (+) Epibatidina en un rango de concentración de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-9</sup> M. La EC<sub>50</sub> obtenida fue de 60 pM. Los datos presentados son la media ± la S.D. tres experimentos en duplicado.

**b.-** Los (●) muestra la curva de dosis respuesta a nicotina en ausencia de AChE, mientras que en (■) se representa los incrementos en el Ca<sup>2+</sup> intrasinaptosomal producidos por la nicotina cuando los sinaptosomas fueron preincubados con 0.3 U de acetilcolinesterasa (AChE) durante 2 min. antes de la aplicación de nicotina. Las EC<sub>50</sub> obtenidas fueron de 7.93±0.77 μM y de 38.6±2.3 pM respectivamente. Los datos presentados son la media ± S.D. de cuatro experimentos en triplicado.

**c.-** Las medidas de ACh se realizaron siguiendo la técnica luminométrica descrita por Israel y Lesbats (1981). En las barras blancas se muestra la liberación de ACh al estimular las terminales sinápticas de cerebro medio de rata con ATP y Ap<sub>5</sub>A. El 100% de liberación de ACh por ATP corresponde a 38.6 pmoles/mg. de proteína, mientras que para el Ap<sub>5</sub>A es de 47.8 pmoles/mg de proteína. En las barras negras se representa la liberación de ACh por ATP y Ap<sub>5</sub>A cuando el Ca<sup>2+</sup> extrasinaptosomal es eliminado del medio.



encuentran mas ágiles mentalmente. La curva dosis respuesta para epibatidina, con entrada de calcio, se muestra en la figura 4-b lo que demuestra la presencia de un receptor nicotínico de tipo  $\alpha 4\beta 2$  o similar,

que es funcional en la terminal presináptica. La afinidad por la epibatidina, con una  $EC_{50}$  de 60 pM ( $6 \times 10^{-11}$ M!) sin necesidad de eliminar la acetilcolina presente en el medio, nos da idea de la peligrosidad de esta sustancia como potencial neurotóxico, y de sus posibilidades como modelo para diseñar nuevos fármacos.

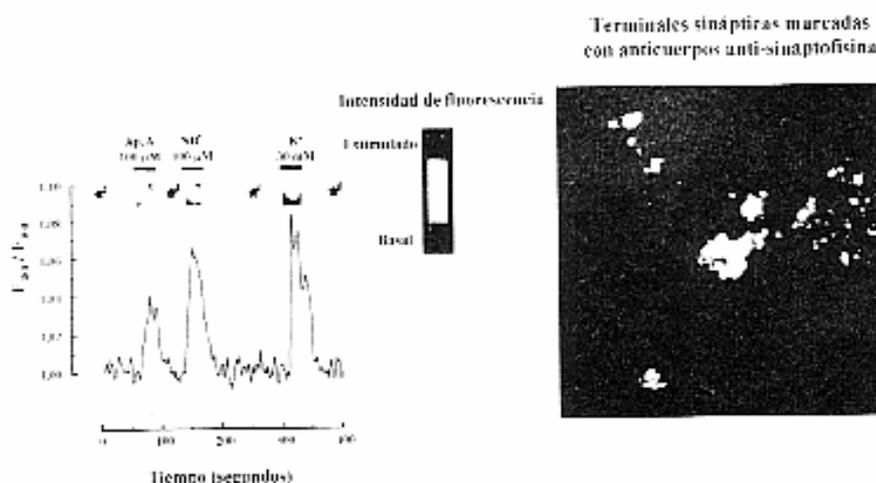
En estas mismas terminales el ATP y los diadenosina polifosfatos son capaces de activar específicamente sus receptores y provocar la liberación exocitótica de acetilcolina, solamente cuando el  $Ca^{2+}$  esta presente en el medio, como se muestra en la figura 4-c. Estos resultados confirman que hay receptores funcionales para nucleótidos y dinucleótidos en las terminales colinérgicas en lo que se refiere a la secreción de acetilcolina.

Figura 5.- Estudios de respuesta en sinaptosomas unicos aislados. Respuesta a nicotina y ApnA. En la imagen de la derecha se observan las terminales nerviosas pegadas a un cubreobjetos con poli-L-lisina y marcados con anticuerpos anti-sinaptofisina. La escala de pseudocolor representa la intensidad de  $F_{400}$  (bajo y alto  $Ca^{2+}$  intrasinaptosomal).

En la gráfica de la izquierda se muestra los cambios de fluorescencia que con respecto al tiempo sufre la terminal sináptica (indicada en la imagen de la derecha), cuando es estimulada con  $Ap_5A$  100  $\mu$ M, nicotina 100  $\mu$ M y  $K^+$  30 mM. Las zonas donde se aplicaron las diferentes sustancias están indicadas mediante barras sólidas en la parte superior del registro. Así mismo se tomó una imagen del sinaptosoma analizado en los momentos previos y posteriores a las diferentes estimulaciones, así como durante la misma.

Para realizar este estudio, los sinaptosomas fueron cargadas con la sonda fluorescente FURA-2 durante una hora a 37  $C^\circ$ . Posteriormente los sinaptosomas fueron limpiados con una solución salina y montados en una pequeña cámara de perfusión en la platina de un microscopio Nikon TE-200. Los sinaptosomas fueron excitados a 2 longitudes de onda diferentes (380 y 400 nm) y la fluorescencia fue recogida a 510 nm (prisma dicróico de paso de banda, 430 nm) a través de un objetivo Nikon fluor X 100, 1.3 NA. Imágenes de 12 bites fueron tomadas cada 822 milisegundos (alternativamente a las dos longitudes de onda a las cuales fueron excitados los sinaptosomas) mediante una cámara Hamamatsu C4880-80CCD, controlada por el software Kinetic (UK). El registro temporal representa la media de la intensidad de luz en una terminal sináptica delimitada por una región elíptica.

Posteriormente los sinaptosomas fueron fijados mediante paraformaldehído al 4%, y marcados con anticuerpos anti-sinaptofisina de ratón. Posteriormente, se revelaron con anticuerpos anti-ratón marcados con fluoresceína.



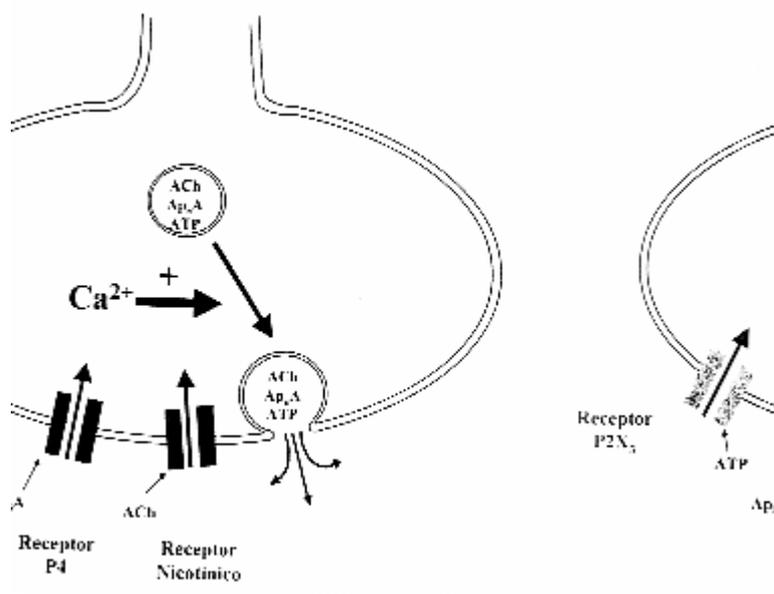
Queda no obstante una pregunta fundamental: ¿Coexisten los receptores ionotrópicos de nucleótidos y los nicotínicos en las mismas terminales presinápticas?. La respuesta requiere una metodología ciertamente sofisticada, que se basa en vídeo imagen asociada a fluorimetría. Esta técnica perfeccionada en nuestro laboratorio, permite visualizar las terminales sinápticas y seguir la variación de la fluorescencia, para las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como fura -2 (Miras-Portugal y col. 1999). Como puede verse en la figura 5 las terminales sinápticas adheridas a un soporte mediante cemento intercelular, pueden ser perfundidas con diversas sustancias en una micro cámara de perfusión. Las terminales responden bien a nicotina, con entrada de calcio, como corresponde a receptores nicotínicos neurales y también a ATP con entrada de calcio por tratarse de un receptor ionotrópico. Las posibilidades que se abren a esta metodología son esperanzadoras, pues permitirán visualizar la interacción de fármacos en sus lugares específicos de acción.

#### CONCLUSIONES

Es bien cierto que para poder estudiar las acciones de los neurotransmisores y de su farmacología y toxicología asociada, se

requieren modelos simples que permitan preguntas sencillas y den respuestas fáciles de interpretar. No obstante, hace mucho tiempo que se sabe que en una terminal sináptica existe más de un transmisor, o co-transmisor. La acetilcolina y el ATP constituyen un par de obligada presencia en las vesículas colinérgicas, con liberación igualmente conjunta. La presencia de receptores nicotínicos presinápticos y su indudable importancia en la regulación de las secreciones neurales tiene ahora una segunda parte, la presencia conjunta de receptores ionotrópicos de nucleótidos en las mismas terminales. Un esquema de la “nueva” terminal colinérgica, que debería llamarse colinérgica/purinérgica, se presenta en la figura 6. Las posibilidades que este tipo de sinapsis abre a la farmacología neural y sobre todo a las disfunciones por escasez de secreción; situaciones que ocurren en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, tiene en este modelo otro punto de partida.

Figura 6.- Esquema del funcionamiento de la sinapsis purinérgica /colinérgica. La estimulación de una terminal colinérgica induce la liberación conjunta de todas las sustancias almacenadas: acetilcolina, ATP y diadenosina polifosfatos (A<sub>2</sub>PnA). Estos compuestos actúan respectivamente sobre los receptores nicotínicos, purinérgicos P2X y de diadenosina polifosfatos ( P4). Todos ellos son receptores ionotrópicos donde entra de preferencia el ion Ca<sup>2+</sup>, lo que incrementa la función excitotónica de la terminal, que requiere este ion para la fusión de la vesícula a la membrana presináptica.



#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación de la Fundación Ramón Areces, mediante un proyecto del área de Neurociencias; a la Comunidad de Madrid por el proyecto CAM 98-8012; al Ministerio de Educación y Cultura por el proyecto PM98-89 y a la Comunidad Europea por el proyecto Biomed-2.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ALEXANDER S.P.H. AND PETERS .A. (1999) Receptor and ion channel nomenclature supplement. *TIPS*
- (2) DENERIS E.S., CONNOLLY J., ROGERS S.W. AND DUVOISIN R. ( 1991). Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *TIPS*- 12-1,34-40
- (3) GALLARDO K.A. AND LESLIE F.M. ( 1998). Nicotine-stimulated release of (3H) Norepinephrine from fetal rat locus coeruleus cells in culture. *J. Neurochem.* 70, 663-670.
- (4) GU J.G. AND MACDERMOTT A.B.( 1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389, 749-753.
- (5) ISRAEL M., AND LESBATS, B. (1981) Chemiluminescent determination of acetylcholine, and continuous detection of its release from Torpedo electric organ synapses and synaptosomes. *Neurochem.* 3, 81-90.
- (6) LENOVERE N., AND CHANGEUX J-P ( 1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine subunit family: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evolution.* 40, 155-172.
- (7) MACDERMOT A. M., ROLE L.W. AND SIEGELBAUM, S. A. (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 443-85.
- (8) MARUBIO L.M., ARROYO-JIMENEZ M.M., CORDERO-ERAUSKIN M., LÉNA C., LE NOVÈRE N., KERCHOVE D'EXAERDE A., HUCHET M., DAMAJ M.I. AND CHANGEUX J-P.(1999). Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398, 805-810.
- (9) MEIR A., GINSBURG S., BUTKEVICH A., KACHALSKY S., KAISEMAN I., AHDUT R., DEMIRGOREN S., AND RAHAMIMOFF R. (1999) Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiological reviews* 79, 1019-1088
- (10) MIRAS-PORTUGAL M.T. (1997). Los diadenosina polifosfatos nuevos transmisores nerviosos. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 63, 663-689.
- (11) MIRAS-PORTUGAL, M.T., GUALIX, J. AND PINTOR J.(1998) The neurotransmitter role of diadenosine polyfosfates ( review). *FEBS Letters.* 430, 78-82
- (12) MIRAS-PORTUGAL M.T., GUALIX J., MATEO J., DIAZ-HERNANDEZ M.A. GOMEZ-VILLAFUERTE, R., CASTRO E. AND PINTOR J. (1999). Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism.. *Progress in Brain Research.* 120. 397-409.

- (13) PERRY E., WALKER M., GRACE J. AND PERRY R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *TINS* 22-6, 273-280
- (14) PINTOR J. AND MIRAS-PORTUGAL M.T. (1995). A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 115, 895-902.
- (15) PINTOR J. TORRES M. AND MIRAS-PORTUGAL M.T. (1991) Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates-Ap4A and Ap5A- from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sciences*, 48, 2317-2324.
- (16) PINTOR J., DIAZ-REY M.A., TORRES M. AND MIRAS-PORTUGAL M.T. (1992) Presence of diadenosine polyphosphates-Ap4A and Ap5A- in rat brain synaptic terminals. Ca<sup>2+</sup> dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neuroscience Letters* 136, 141-144
- (17) RALEVIC V. AND BURNSTOCK G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50, 415-492
- (18) RICHARDSON P. AND BROWN, S.J. (1987). ATP release from affinity-purified cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 48, 622-623.
- (19) RODRIGUEZ DEL CASTILLO A., TORRES M., DELICADO E.G. AND MIRAS-PORTUGAL M.T. (1988) . Subcellular distribution studies of Ap4A and Ap5A in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. 51, 1969-1703.
- (20) SIEGEL G.J., AGRANOFF B.W., ALBERS R.W., FISHER S.K. AND UHLER M.D. (1999). *Basic Neurochemistry*. Sexta edición. Lippincott-Raven.- New York.
- (21) WONNACOTT S. (1997). Presynaptic nicotinic Ach receptors. *TINS* 20-2, 92-98

## **Interacción entre hormonas tiroideas y factores de crecimiento IGFs<sup>1</sup>**

A.M. PASCUAL-LEONE

*Instituto de Bioquímica (C. mixto CSIC-UCM).- Facultad de Farmacia.- Universidad Complutense.- Madrid*

### RESUMEN

Las hormonas tiroideas y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son factores esenciales regulando el crecimiento en etapas inmaduras. Ambos factores endocrinos están implicados en regulaciones metabólicas y disminuye su secreción en estados de subnutrición. El estudio de su interacción es un problema complejo que aporta datos interesantes a la Biología del Desarrollo por una parte y a la Endocrinología Molecular actual por otra. La Endocrinología Molecular tiene un gran desconocimiento acerca de las interrelaciones entre hormonas clásicas y factores de crecimiento y su conocimiento es particularmente interesante en momentos de gran proliferación celular como es el desarrollo.

Este trabajo muestra como se regulan las secreciones de IGFs en un modelo de hipotiroidismo, tiroidectomía, y en otro de diabetes, tratamiento con estreptozotocina, cuando se dan dosis externas de tiroxina T<sub>4</sub> en periodos neonatal y adulto. Se analizan los valores circulantes de IGF-I y II en ambas poblaciones neonatales de rata y de IGF-I en las dos poblaciones adultas, así como la expresión del m-RNA hepático. Se concluye que paralelamente a la acción mediadora de la insulina en etapa neonatal, y de la GH en etapa adulta; los efectos de la tiroxina sobre la secreción de IGFs parecen ejercerse a través de una

---

<sup>1</sup> Conferencia impartida en la Real Academia de Farmacia el 3 de Junio de 1999

acción directa de las hormonas tiroideas modulando la actividad desyodásica en hígado y por consiguiente los niveles de T<sub>3</sub> hepáticos y plasmáticos.

**Palabras clave:** Hormonas tiroideas.- Factores de crecimiento.- insulina.- Metabolismo.

## SUMMARY

### **Interrelationships between thyroid hormones and (IGFs)**

Thyroid hormones and insulin-like growth factors (IGFs) play a key role in growth regulation during immature stages of life. Both endocrine factors are involved in the regulation of metabolism and their secretion is decreased in a situation of undernutrition.

Although the interaction between thyroid hormones and IGFs represents a complex question, its study has produced interesting data to Biology of Development and the current Molecular Endocrinology. The interrelationship between classic hormones and growth factors, especially during periods of enhanced cell proliferation such as perinatal development, remains largely unknown.

The present work shows the IGFs regulation when thyroxine (T<sub>4</sub>) is administered to neonatal and adult rats submitted to two experimental models: a) hypothyroidism induced by thyroidectomy, and b) diabetes induced by streptozotocin administration. Serum levels of IGF-I and -II in neonatal rats and IGF-I in adults as well as their liver mRNA expression were determined. It is concluded that, in addition to the mediating effect of insulin in neonatal rats and of GH in adults, thyroid hormones seem to have a direct effect on IGFs secretion by regulating liver 5'-deiodinase and, consequently, inducing changes in liver synthesis and plasma levels of T<sub>3</sub>.

**Key words:** Thyroid hormones.- Growth factors.- Insulin.

## 1. INTRODUCCION

El estudio de la interacción entre hormonas tiroideas y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) tiene una gran importancia como aporte de conocimiento en dos vertientes de investigación biomédica muy interesantes como son la Biología del Desarrollo y la Endocrinología Molecular actual. Vamos a dividir la exposición en las partes reseñadas en tabla 1.

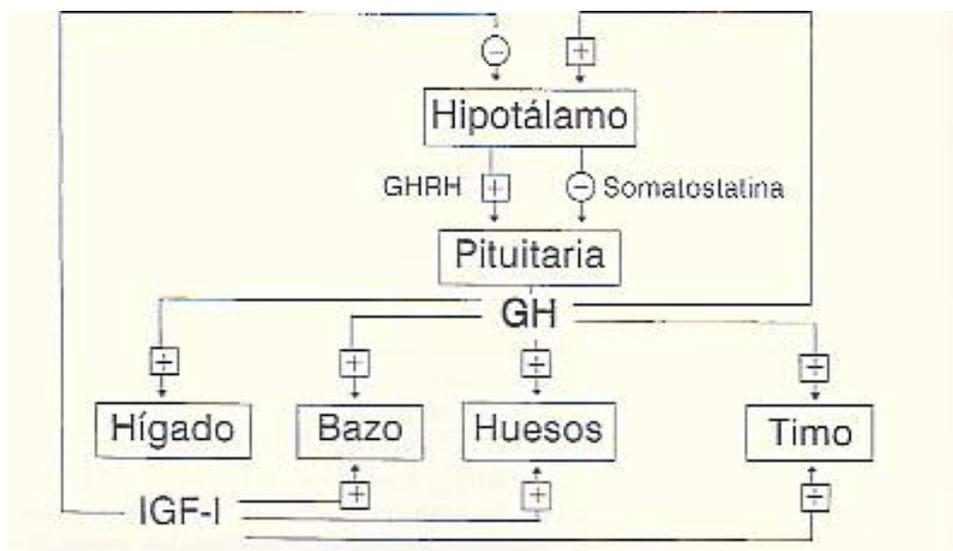
**TABLA 1**

- 
- \* Importancia del estudio de h. tiroideas/IGFs en Biología del Desarrollo y en Endocrinología Molecular
  - \* Resultados del efecto de la tiroidectomía y posterior rehabilitación con T<sub>4</sub> sobre la secreción de IGF-I
  - \* Resultados de la secreción de IGF-I en ratas diabéticas tratadas con T<sub>4</sub>
  - \* Implicación de los niveles de T<sub>3</sub> y de la actividad 5'D-I en hígado sobre la secreción de IGF-I en las anteriores poblaciones
- 

### 1.1. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)

Los factores de crecimiento similares a la insulina son polipéptidos con estructura parecida a la proinsulina están constituidos por el IGF-I e IGF-II, y las diferencias estructurales entre ellos están señaladas por los cambios de determinados aminoácidos entre uno y otro (1). Tienen acciones proliferativas y de diferenciación celular en múltiples tejidos: bazo, sistema esquelético, médula de los huesos, y timo (Fig. 1), es decir están implicados en la linfopoyesis (2), miogénesis (3) y además tienen acciones proliferativas celulares en la mama, en las gónadas, testículos y ovarios, y trabajos últimos señalan que parecen regular la apoptosis celular, (muerte celular programada). Así pues son factores endocrinos esenciales como reguladores del desarrollo (4,5). El estudio de su secreción hay que considerarlo dentro del axis constituido por hormona de crecimiento/factores de crecimiento similares a insulina (GH/IGFs). Es decir su secreción es estimulada en hígado por la hormona de crecimiento (GH) que a su vez es secretada en la hipófisis estimulada e inhibida por hormonas hipotalámicas (6). Además también la GH estimula en hígado la secreción de las proteínas ligadoras (IGFBPs) con las cuales, a diferencia de la insulina, viajan en plasma. Estas proteínas regulan su disponibilidad, es decir el acceso de los péptidos a través de la pared celular al interior de la célula.

Figura 1 Esquema de la secreción de IGF-I estimulada por la hormona de crecimiento (GH) en hígado, bazo, huesos y timo.



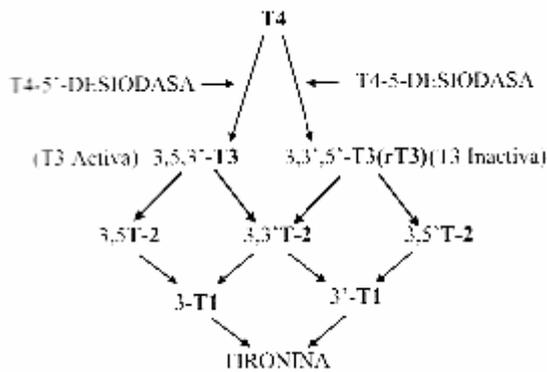
El IGF-II está reputado la hormona de crecimiento en el feto. Ratones transgénicos que no expresan IGF-II mueren en etapa fetal, sin embargo la hormona de crecimiento que circula en altos niveles en periodo fetal no es una hormona de crecimiento para el feto. Se cree que es una hormona metabólica de la cual no se conocen bien sus acciones. Desde hace mucho tiempo se sabe que decapitando fetos "in utero" se elimina la hormona de crecimiento y los fetos crecen de igual forma.

Por todo ello el interés de los IGFs como reguladores del crecimiento está actualmente absolutamente establecido. Los IGFs son absolutamente dependientes en su secreción del estado nutricional (6,7). Disminuyen en estados de subnutrición y aumentan sus valores circulantes en circunstancias en las cuales se normaliza la ingesta (8-11). Además la secreción de IGFs presenta características diferentes según se considere el estado inmaduro o el adulto, de tal forma que el IGF-I es el IGF característico del estado adulto siendo el IGF-II el abundante en periodo fetal. Todas estas razones hacen que el estudio de la secreción de IGFs sea enormemente interesante para la Biología del Desarrollo.

## 1.2. Hormonas Tiroideas

La importancia de las hormonas tiroideas en la Biología del Desarrollo es de sobra conocida sobre todo en lo concerniente al Sistema Nervioso Central. Sin embargo hay que recordar que las hormonas tiroideas están implicadas también en diversos aspectos del metabolismo ya que provocan estados catabólicos y oxidativos propiciando la aparición de enzimas claves del metabolismo y modificando la secreción de hormonas como la insulina o las catecolaminas (12). Es importante recordar que la tiroxina, la hormona clásica secretada por la glándula tiroidea es una pro-hormona de la cual por desiodación se produce la triiodotironina ( $T_3$ ) (Fig.2).

Figura 2 Esquema del proceso de desyodación de la tiroxina ( $T_4$ ) a triiodotironina activa ( $T_3$ ) y a  $T_3$  inactiva ( $rT_3$ ), así como la degradación de  $T_3$  a tironinas ( $T_2$  y  $T_1$ ).



## 2. RELEVANCIA DEL ESTUDIO EN BIOLOGIA DEL DESARROLLO

Así pues, por la importancia de ambas hormonas como reguladoras del crecimiento el estudio de su interacción es muy interesante en Biología del Desarrollo y la complejidad del tema se comprende "a priori" porque ambos factores endocrinos tienen implicaciones metabólicas (Tabla 2).

TABLA 2

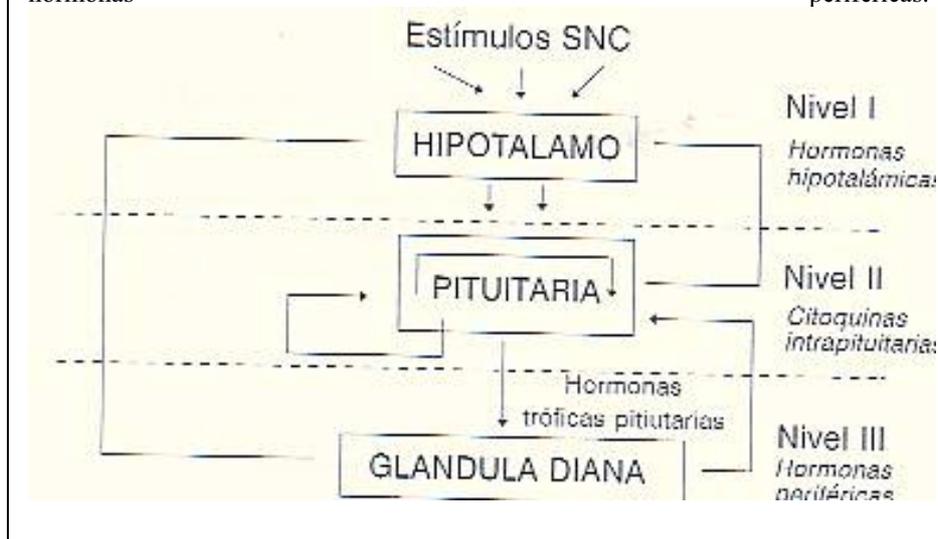
**Relevancia de la interacción de H. Tiroideas e IGFs en  
Biología del Desarrollo y su complejidad**

- \* Ambos factores endocrinos son esenciales como reguladores del crecimiento
- \* Secreción de IGFs dependiente del estado nutricional y hormonas tiroideas regulan todos los aspectos del metabolismo

### 3. IMPORTANCIA DE ESTE ESTUDIO EN LA ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR ACTUAL

El sistema nervioso, el endocrino y el inmune son los tres sistemas que coordinan órganos y tejidos en los mamíferos. Para conseguir la homeostasis necesaria en estados de salud se necesita que los tres sistemas estén integrados. La integración entre sistema nervioso y

Figura 3.- Niveles de control de la secreción de hormonas hipofisarias en la glándula pituitaria. Nivel I: estímulo de hormonas hipotalámicas. Nivel II: citoquinas intrapituitarias. Nivel III: retroalimentación negativa de las distintas hormonas periféricas.



endocrino es evidente desde que se sabe que las hormonas hipotalámicas estimulan en la pituitaria las hormonas hipofisiarias. Pero durante muchos años no se ha sabido nada con respecto a la integración entre sistema endocrino y sistema inmune. Sin embargo, en 1930 Smith (13) vió que cuando se hipofisectomizaba un animal se producía una ablación del timo. No obstante no se conocían los mecanismos por los cuales se integraban el sistema endocrino y el inmune. Actualmente se sabe que las secreciones de la pituitaria se regulan a tres niveles (Fig.3). En un primer nivel están las hormonas hipotalámicas que estimulan las secreciones pituitarias y en un tercer nivel están las hormonas periféricas modulando la secreción por retroalimentación negativa, todo lo cual se conoce desde hace años. Pero actualmente se sabe que existe un segundo nivel de modulación por las citoquinas intrapituitarias entre las cuales está la IGF-I.

Las citoquinas son péptidos solubles que producen y modulan proliferación celular en órganos hematopoyéticos. Fueron descritas las citoquinas en estados inflamatorios y parecían ser moduladores del sistema inmune. Sin embargo hoy se conoce que están en todas las glándulas endocrinas y que sus acciones se solapan con las acciones de los factores de crecimiento (14). Sin embargo la interacción entre hormonas clásicas y factores de crecimiento es uno de los retos que tiene planteados la endocrinología molecular actual (tabla 3).

El interés en clínica de estas cuestiones es evidente ya que el conocimiento de la interacción entre hormonas clásicas y factores de crecimiento permitirá comprender el proceso que conduce al desarrollo de tumores o neoplasias y por consiguiente como poder prevenirlos. En tabla 3 se muestra el resumen de las aportaciones en la endocrinología actual que representan estas investigaciones.

**TABLA 3**

---

*Aportes al estudio de la Endocrinología Molecular*

---

\* Existe un control del Sistema Nervioso Central (SNC) integrador de sistema nervioso, endocrino e inmune modulado por citoquinas o factores de crecimiento (IGFs)

\* La interacción entre h. tiroideas e IGFs aporta datos al conocimiento de la interacción entre hormonas clásicas y factores de crecimiento

---

#### 4. INTRODUCCION AL ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE HORMONAS TIROIDEAS Y SECRECION DE IGF-I.

El hipotiroidismo presenta valores disminuidos de IGF-I y también de la disponibilidad de IGF-I a nivel celular (15). El hipertiroidismo cursa con valores altos de IGF-I y también disminución de su disponibilidad a nivel celular (16).

Casi todos los autores al establecer el estudio entre hormonas tiroideas e IGFs pensaron que el mediador de dichas acciones era la hormona de crecimiento (GH) ya que las hormonas tiroideas expresan el gen de GH en pituitaria (17). Sin embargo hay muchas cuestiones que no se explican aceptando la GH como mediador: a) los animales hipotiroideos que reciben GH no aumentan los niveles de IGF-I, hay que darles T<sub>4</sub> (16), b) los animales hipofisectomizados tampoco restauran el IGF-I tan solo recibiendo GH, hay que darles también T<sub>4</sub> (18), c) perfundiendo un hígado con T<sub>4</sub> se produce una secreción de IGF-I (19). Todos estos datos experimentales sugieren por una parte que el mediador de las acciones de las hormonas tiroideas no es solamente la GH, y por otra, que las hormonas tiroideas parecen tener una acción específica sobre la secreción de IGF-I.

#### 4.1. Resultados obtenidos normalizando los niveles de IGF-I con dosis de tiroxina en animales tiroidectomizados neonatales, destetados y adultos.

En tabla 4 se presenta el modelo de normalización de niveles de IGF-I seguido en las tres poblaciones tiroidectomizadas: neonatales, destetados y adultos.

Tabla 4

##### **Modelo de hipotiroidismo y rehabilitación con $T_4$**

*N: población neonatal. Desde el día 2 de vida reciben metimazol (MMI) en el agua de bebida.  $T_5$ : Día 5 tiroidectomía.  $T_5 + T_4$  (RP): El día 15 se da pellet de tiroxina ( $T_4$ ) y se sacrifican el día 20. C: Población control.*

*D: población destetada. Desde el día 15 de vida reciben metimazol (MMI) en el agua de bebida.  $T_{22}$ : Día 22 tiroidectomía.  $T_{22} + T_4$  (RP<sub>5</sub>): El día 32 se da pellet de tiroxina ( $T_4$ ) y se sacrifican 5 días después.  $T_{22} + T_4$  (RP<sub>10</sub>): Se sacrifican el día 42 de vida, 10 días después del tratamiento con  $T_4$ . C: Población control.*

*A: población adulta. Desde el día 65 de vida reciben metimazol (MMI) en el agua de bebida.  $T_{72}$ : Día 72 tiroidectomía.  $T_{72} + T_4$  (RP<sub>5</sub>): Rehabilitación con pellet de tiroxina ( $T_4$ ) durante 5 días.  $T_{72} + T_4$  (RP<sub>10</sub>): Rehabilitación con pellet de  $T_4$  durante 10 días. C: Población control.*

Las dosis dadas a los animales neonatales tiroidectomizados fueron más pequeñas ( $1.5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  de peso de  $T_4$ ) que las suministradas a los adultos ( $1,75 \mu\text{g}/100\text{g}$  de peso). Se obtiene una buena normalización de IGF-I tanto a nivel circulante como en el mRNA hepático sugiriendo una regulación a nivel transcripcional en adultos y sin embargo se restaura tan solo el IGF-I circulante en neonatos (tabla 5). Cuando además se hicieron análisis de correlación lineal entre el IGF-I circulante y los niveles de insulina en plasma, se encuentra una correlación positiva muy alta, con un coeficiente de correlación casi de uno, en la población neonatal tiroidectomizada y tratada con  $T_4$ . Pero dicha alta correlación se encuentra entre la hormona de crecimiento e IGF-I en las poblaciones adultas y destetadas tiroidectomizadas y tratadas con  $T_4$  (20). Esto ha sido ratificado en estudios *in vitro* (21).

Así pues, en estos experimentos de animales tiroidectomizados y además tratados con  $T_4$ , se consolida que el papel mediador de las hormonas

tiroideas sobre la secreción de IGF-I es la insulina en periodo neonatal, pasando a ser la hormona de crecimiento en periodo adulto (20).

**TABLA 5**

*Niveles séricos de IGF-I por radioinmunoanálisis y expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) hepático de IGF-I obtenidos por análisis de protección de la RNasa. Valores obtenidos en poblaciones tiroidectomizadas neonatales (T<sub>5</sub>), destetadas (T<sub>22</sub>) y adultas (T<sub>72</sub>) rehabilitadas durante 5 días con pellet de T<sub>4</sub> (RP neonatales y RP<sub>5</sub> destetadas y adultas) o bien durante 10 días (RP<sub>10</sub>).*

ANIMALES T + T <sub>4</sub>		
	IGF-I SERICO (ng/ml)	EXPRESION ARNm IGF-I Densitometría (Unidades arbitrarias)
<b>NEONATOS</b>		
T <sub>5</sub>	294.4 ± 7.5 <sup>a</sup>	7499 ± 542 <sup>a</sup>
C	148.1 ± 17.0	5110 ± 41
T <sub>5</sub> + T <sub>4</sub> (RP)	151.1 ± 22.3 <sup>b</sup>	8416 ± 249 <sup>a</sup>
<b>DESTETADAS</b>		
T <sub>22</sub>	94.2 ± 7.5 <sup>a</sup>	760 ± 159 <sup>a</sup>
C	267.0 ± 17.1	1646 ± 225
T <sub>22</sub> + T <sub>4</sub> (RP <sub>5</sub> )	136.4 ± 15.2 <sup>a</sup>	1534 ± 140 <sup>b</sup>
T <sub>22</sub> + T <sub>4</sub> RP <sub>10</sub> )	155.4 ± 31.4	1774 ± 132 <sup>b</sup>
<b>ADULTOS</b>		
T <sub>72</sub>	264.3 ± 25.1 <sup>a</sup>	46 ± 3 <sup>a</sup>
C	536.1 ± 84.1	784 ± 14
T <sub>72</sub> + T <sub>4</sub> (RP <sub>5</sub> )	430.2 ± 51.7 <sup>b</sup>	579 ± 122 <sup>b</sup>
T <sub>72</sub> + T <sub>4</sub> (RP <sub>10</sub> )	490.9 ± 24.7 <sup>b</sup>	763 ± 73 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 respecto a los animales control

<sup>b</sup> p<0.05 respecto a los animales T

#### 4.2. Resultados de la secreción de IGF-I en animales diabéticos y tratados con tiroxina.

Para profundizar en el conocimiento de la interacción entre hormonas tiroideas y secreción de IGF-I se pensó en estudiar un modelo de diabetes.

La diabetes cursa en adulto con niveles disminuidos de hormonas tiroideas sobre todo, con niveles disminuidos de hormona tiroidea biológicamente activa T<sub>3</sub>, por disminución de la desyodasa hepática (22). También cursa con valores disminuidos de IGF-I y por consiguiente de insulina, así como paralelamente con niveles disminuidos de hormona de crecimiento. La pregunta que nos hicimos fue si la tiroxina restablecería los niveles de IGF-I en animales neonatales diabéticos; en los cuales no hay insulina puesto que habíamos previamente establecido que el mediador de las acciones de T<sub>4</sub> sobre la secreción de IGF-I es dicha hormona en periodo neonatal (23). En periodo adulto diabético se trató de conocer si con la GH disminuida por la diabetes las dosis de T<sub>4</sub> rehabilitarían los niveles de IGF-I; ya que en dicho periodo el mediador establecido era la GH (23). En tabla 6 puede verse el modelo de rehabilitación utilizado en la diabetes.

TABLA 6

***Modelo de diabetes con estreptozotocina (STZ) y rehabilitación con tiroxina (T<sub>4</sub>).***

*N: población neonatal. D: STZ dado a 10 días de vida. D + T<sub>4</sub>: Desde los 15 días de vida, comprobando que eran diabéticas, se dieron dosis de T<sub>4</sub> y se sacrificaron a 20 días de vida. C: Población control.*

*A: población adulta. D: STZ dado a 75 días de vida. D + T<sub>4</sub>: Desde los 82 días de vida se dió T<sub>4</sub> diariamente sacrificándose a 87 días de vida.*

En tabla 7 se muestra una perfecta rehabilitación de IGF-I circulante y de mRNA hepático en los animales neonatales diabéticos mucho más completa que la restauración encontrada para los animales neonatales tiroidectomizados que habían recibido la misma pequeña dosis de tiroxina (T<sub>4</sub>). Contrariamente los animales diabéticos adultos no normalizan sus

niveles de IGF-I después de recibir la misma dosis de T<sub>4</sub> que los animales tiroidectomizados, ni en suero ni en la expresión de su mRNA hepático.

**TABLA 7**

*Niveles séricos de IGF-I obtenidos por radioinmunoanálisis de IGF-I y expresión del ácido ribonucleico (ARNm) de IGF-I por análisis de protección de la RNasa. Valores obtenidos en animales diabéticos (D) así como en animales que reciben dosis de T<sub>4</sub> por pellet neonatales y adultos (D + T<sub>4</sub>).*

ANIMALES D + T <sub>4</sub>		
	IGF-I SERICO (ng/ml)	EXPRESION ARNm IGF-I Densitometría (Unidades arbitrarias)
<b>NEONATOS</b>		
C	92.7 ± 2.6	875 ± 60
D	49.2 ± 4.9 <sup>a</sup>	310 ± 38 <sup>a</sup>
D + T <sub>4</sub>	104.7 ± 7.5 <sup>a</sup>	772 ± 26 <sup>a</sup>
<b>ADULTOS</b>		
C	356.8 ± 19.4	1465 ± 90 <sup>a</sup>
D	169.7 ± 19.8 <sup>a</sup>	509 ± 39
D + T <sub>4</sub>	188.7 ± 13.3 <sup>a</sup>	566 ± 18 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 respecto a los animales control

<sup>b</sup> p<0.05 respecto a los animales D

Todo ello va acompañado de una rehabilitación de los niveles circulantes de hormonas tiroideas en los animales neonatales diabéticos después de recibir T<sub>4</sub> que no se encuentra en los adultos diabéticos después de recibir tiroxina.

#### **4.3. Comparación de niveles de hormonas tiroideas en plasma antes y después de recibir tiroxina en ambos animales tiroidectomizados y diabéticos.**

Comparando los niveles de hormonas tiroideas antes de recibir tiroxina y después de ello en los animales tiroidectomizados y en los diabéticos (tabla 8) se aprecia que los tiroidectomizados presentan niveles muy bajos con respecto a controles que se normalizan después de recibir tiroxina. La disminución de hormonas tiroideas es además del mismo orden en la población neonatal tiroidectomizada que en los adultos tiroidectomizados con respecto a controles.

Sin embargo los animales neonatales diabéticos disminuyeron sus hormonas tiroideas circulantes mucho menos respecto a controles que los adultos diabéticos y normalizan los neonatos diabéticos sus hormonas tiroideas perfectamente después de recibir tiroxina mientras no lo hacen los adultos diabéticos. Estas diferencias con respecto a las hormonas tiroideas circulantes en las poblaciones tiroidectomizadas y diabéticas sugieren unas distintas variaciones en los cambios de la desyodasa hepática puesto que la hormona biológicamente activa  $T_3$ , la triiodotironina, proviene de la  $T_4$ , tetraiodotironina, fundamentalmente, por desyodación en hígado.

TABLA 8

A) Niveles de  $T_3$  y  $T_4$  séricos en animales neonatos, destetados y adultos tiroidectomizados  $T_5$ ,  $T_{22}$  y  $T_{72}$  respectivamente. **C**: animales control.  **$T_5 + T_4(RP)$** : Animales neonatales tiroidectomizados a los 22 días y rehabilitados con pellet de  $T_4$ .  **$T_{22} + T_4(RP_5)$  o  $(RP_{10})$** : Animales destetados tiroidectomizados a 22 días y rehabilitados con pellet de  $T_4$  durante 5 días ( $RP_5$ ) ó 10 días ( $RP_{10}$ ).  **$T_{72} + T_4(RP_5)$  o  $(RP_{10})$** : Animales adultos tiroidectomizados a 72 días y rehabilitados con pellet de  $T_4$  durante 5 días ( $RP_5$ ) ó 10 días ( $RP_{10}$ ).

B) **D**: Animales hechos diabéticos con estreptozotocina (STZ), neonatales y adultos.  **$D + T_4$** : Animales diabéticos, neonatales y adultos, rehabilitados con  $T_4$ .

**A)**

ANIMALES T + $T_4$		
	$T_3$ SERICA (ng/dl)	$T_4$ SERICA ( $\mu$ g/dl)
<b>NEONATOS</b>		
$T_5$	$7.68 \pm 0.02^a$	$1.13 \pm 0.55^a$
C	$99.52 \pm 6.51$	$5.37 \pm 0.46$
$T_5 + T_4$ (R)	$15.15 \pm 2.43^a$	$1.41 \pm 0.05^a$
$T_5 + T_4$ (RP)	$33.54 \pm 4.72^{a,b}$	$2.28 \pm 0.79^a$
<b>DESTETADAS</b>		
$T_{22}$	$7.59 \pm 0.01^a$	$0.49 \pm 0.03^a$
C	$148.65 \pm 21.02$	$7.09 \pm 1.26$
$T_{22} + T_4$ ( $RP_5$ )	$343.46 \pm 42.23^{a,b}$	$12.11 \pm 1.96^{a,b}$
$T_{22} + T_4$ ( $RP_{10}$ )	$125.41 \pm 31.4^{b,c}$	$5.71 \pm 0.85^b$
<b>ADULTOS</b>		
$T_{72}$	$7.88 \pm 0.49^a$	$0.42 \pm 0.08^a$
C	$94.53 \pm 4.46$	$5.26 \pm 0.63$
$T_{72} + T_4$ ( $RP_5$ )	$99.45 \pm 5.77^b$	$6.77 \pm 0.12^b$
$T_{72} + T_4$ ( $RP_{10}$ )	$74.02 \pm 2.69^b$	$5.89 \pm 0.94^b$
<sup>a</sup> $p < 0.05$ respecto a los animales control <sup>b</sup> $p < 0.05$ respecto a los animales T <sup>c</sup> $p < 0.05$ respecto a los animales T+ $T_4$		
<b>B)</b>		
ANIMALES D + $T_4$		
	$T_3$ SERICA	$T_4$ SERICA

	(ng/dl)	(µg/dl)
<b>NEONATOS</b>		
C	90.50 ± 1.84	5.85 ± 0.58
D	59.26 ± 30.8 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.62 <sup>a</sup>
D + T <sub>4</sub>	98.10 ± 6.89 <sup>b</sup>	6.61 ± 1.32 <sup>b</sup>
<b>ADULTOS</b>		
C	94.53 ± 4.46	5.25 ± 0.63
D	11.93 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.15 <sup>a</sup>
D + T <sub>4</sub>	51.89 ± 8.58 <sup>a,b</sup>	3.71 ± 0.91 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> p<0.05 respecto a los animales control

<sup>b</sup> p<0.05 respecto a los animales D

## 5. CONCLUSIONES FINALES

Efectivamente la actividad desyodásica no cambia en los animales neonatales diabéticos mientras disminuye mucho en los adultos. Sin embargo las variaciones en actividad desyodásica hepática son las mismas en los animales tiroidectomizados neonatales y adultos por ello los niveles de hormonas tiroideas son parecidos antes y después de recibir tiroxina.

Entonces cabe concluir que el contenido de T<sub>3</sub>, hormona biológicamente activa, en hígado parece regular la normalización de IGF-I, a la vez que el contenido hepático de T<sub>3</sub> y por consiguiente los niveles en plasma puesto que ellos son siempre dependientes de la actividad desyodásica hepática. Se sugiere que, como anunciado en la literatura (19), existe una acción directa de las hormonas tiroideas regulando la secreción de IGF-I.

Por último, esa distinta adaptación en animales diabéticos neonatales y adultos con respecto a la desyodada hepática parece tener mucho sentido biológico. Los animales diabéticos neonatales en una situación de ausencia de insulina, hormona clave para regular el crecimiento, tienden a no disminuir además la actividad desyodásica hepática, con lo cual no decrecen el contenido de hormonas tiroideas hepático ni los niveles circulantes puesto que dichas hormonas también son muy necesarias para la regulación del crecimiento. Los animales

adultos diabéticos sin embargo, en ausencia de insulina, la hormona clave anabólica, como ya no les es vital la regulación de su crecimiento, disminuyen la desyodasa hepática y por consiguiente las tasas de hormonas tiroideas circulantes probablemente para decrecer la acción catabólica de éstas hormonas en ausencia de insulina, la hormona anabólica por excelencia.

### ABREVIATURAS

IGF-I y -II	Factores de crecimiento similares a la insulina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
T <sub>3</sub>	Triiodotironina biológicamente activa
rT <sub>3</sub>	Triiodotironina biológicamente inactiva
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
GH	Hormona de crecimiento hipofisiaria
T	Tiroidectomía
STZ	Estreptozotocina
MMI	Metimazol
D	Ratas diabéticas
C	Ratas control
T <sub>15</sub>	Ratas tiroidectomizadas a 15 días de vida
T <sub>22</sub>	Ratas tiroidectomizadas a 22 días de vida
T <sub>72</sub>	Ratas tiroidectomizadas a 72 días de vida

### AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las instituciones: Comunidad de Madrid (CAM), Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) que ininterrumpidamente desde 1970 han subvencionado nuestro trabajo. También quiero resaltar que nuestros resultados son una labor de equipo cuyos nombres figuran en la bibliografía adjunta; todos mis colaboradores han sido un estímulo continuado en mi trabajo y sin su ayuda, no habría podido realizarse este trabajo, ni esta línea de investigación. Agradezco

igualmente a la Dra. Morreale su ayuda y colaboración en las determinaciones de hormonas tiroideas. Por último quiero resaltar que los resultados concretos expuestos en este trabajo son una consecuencia de las conclusiones obtenidas en la Tesis de Sonia Ramos Rivero leída el 22 de marzo de 1999 en la Facultad de Farmacia y calificada de Sobresaliente *cum laude*.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) DAUGHADAY WH. Peptide messenger ribonucleid acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Reviews* 10:68-89 (1989).
- (2) CLARK R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine Reviews* 18:157 (1997).
- (3) FLORINI JR, EWTON DZ, COOLICAN SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine Reviews* 15:481 (1996).
- (4) STRAUSS DS. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *Faseb Journal* 8:6-12 (1994).
- (5) JONES JL, CLEMMONS DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 16:3-33 (1995).
- (6) PASCUAL-LEONE AM. Nutrición y desarrollo: regulación de los factores de crecimiento IGFs. *Annales de la Real Academia de Farmacia* 64:347-365 (1998).
- (7) RIVERO F, GOYA L, ALAEZ C, PASCUAL-LEONE AM. Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *Journal of Endocrinology* 145:427-440 (1995).
- (8) THISSEN JP, KETELSLEGERS JM, UNDERWOOD LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 15:80-103 (1994).
- (9) CLEMMONS DR, UNDERWOOD LE. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Reviews of Nutrition* 11:393-412 (1991).
- (10) GOYA L, RIVERO F, MARTIN MA, ARAHUETES R, HERNANDEZ ER, PASCUAL-LEONE AM. Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGF and IGFBP. *American Journal of Physiology* 271(Endocrine and Metabolism):E223-231 (1996).
- (11) GOYA L, RIVERO F, MARTIN MA, ALVAREZ C, RAMOS S, DE LA PUENTE A, PASCUAL-LEONE AM. Liver mRNA expression of IGF-I and IGFBPs in adult undernourished diabetic rats. *Life Sciences* 64:2255-2271 (1999).

- (12) BEYLOT M, LAVILLE M. Thyroid hormone and intermediary metabolism. In: The thyroid and tissues, pp 44-59. Orbiuzzi J, Lecler J, Schattauer FK (eds). European Thyroid Symposium Strasbourg. Germany (1994).
- (13) SMITH P. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anat Rec* 47:119-143 (1930).
- (14) RAY D, MELMED S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocrine Reviews* 18:206 (1997).
- (15) MIELL JP, TAYLOR AM, ZINI M, MAHESHWARI HG, ROSS RJM, VALCAVI R. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone and IGF binding proteins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76:950-953 (1993).
- (16) BURSTEIN PJ, DRAZNIN B, JOHNSON CJ, SCHALCH DS. The effects of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. *Endocrinology* 104:1107-1111 (1979).
- (17) EVANS RM, BIRNBERG NC, ROSENFELD MG. Glucocorticoid and thyroid hormones transcriptionally regulate growth hormone gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7659-7663 (1982).
  
- (18) GASPARD T, WONDERGEM R, HAMAMDZIC M, KLITGAARD HM. Serum somatomedin stimulation in thyroxine-treated hypophysectomized rats. *Endocrinology* 132:781-788 (1978).
- (19) IKEDA T, FUJIMAMA K, TAKEUCHI T. Effect of thyroid hormone on somatomedin C release from perfused rat liver. *Experientia* 45:170-180 (1989).
- (20) RAMOS S, GOYA L, MARTIN MA, PASCUAL-LEONE AM. Effect of thyroxine administration on the IGFs/IGFBPs system from neonatal to adult thyroidectomized rats: insulin and GH as mediators. En prensa en *American Journal of Physiology*.
- (21) GOYA L, DE LA PUENTE A, RAMOS S, MARTIN MA, ESCRIVA F, PASCUAL-LEONE AM. (1999) Regulation of IGF-I and -II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *Journal Biological Chemistry* 274:24633-24640.
- (22) WARTOFSKI L, BURMAN KD. Alteration in thyroid function in patients with systemic illness: the euthyroid sick syndrome. *Endocrine Review* 3:164-217 (1982).
- (23) RAMOS S, GOYA L, ALVAREZ C, PASCUAL-LEONE AM. Mechanism of hypothyroidism action on insulin-like growth factor-I and -II from neonatal to adult rats: insulin mediates thyroid hormone effects in the neonatal period. *Endocrinology* 139:4782-4792 (1998).

## **Determinación de las constantes de la reacción de hidrólisis de Ceftizoxima por cromatografía de líquidos**

A.L.DOADRIO Y R.ORENGA

*Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid*

*Teléfono 913941789. Fax 913941786*

*e-mail: antoniov@eucmax.sim.ucm.es*

### RESUMEN

Hemos realizado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 8 y a temperaturas de 30 a 60°C. Así mismo, a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos y del estudio de los espectros de U.V. de las fracciones cromatográficas eluidas, es posible deducir el mecanismo de reacción que tiene lugar en nuestras condiciones de ensayo.

**Palabras clave:** Ceftizoxima.-Hidrólisis.-HPLC

### SUMMARY

#### **Determination of ceftizoxime hydrolysis constants reaction by high pressure liquid chromatography**

In this paper, we have carried out the determination of ceftizoxime constants reaction by liquid chromatography at a pH range of 2-8 and temperatures of 30-60°C.

From the study of chromatographic profiles and U.V. spectra of the eluted fractions, it is possible to propose the reaction mechanism consider in the assay conditions.

**Key words:** Ceftizoxime.-Hydrolysis.-HPLC

## INTRODUCCIÓN

Las reacciones de hidrólisis de cefalosporinas y penicilinas son muy similares (1,2). La cinética de la reacción de hidrólisis de penicilinas ha sido determinada por métodos potenciométricos y espectrofotométricos (3), pero estos métodos resultaron ser poco selectivos.

En otros trabajos publicados por nosotros (4), realizamos la determinación de estas constantes por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), puesto que es un método mucho más selectivo que los anteriores, y tiene la ventaja de que se puede separar al antibiótico de sus productos de hidrólisis, ya que por la alta capacidad de separación de la técnica, es posible la elución de los solutos en picos cromatográficos diferentes, con lo cual se simplifica el estudio del mecanismo de reacción al poder identificar los productos que se van formando.

En éste estudio, hemos efectuado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 8 y sometiéndola a temperaturas de 30 a 60°C, con el fin de estudiar el efecto que el pH y la temperatura, ejercen sobre el mecanismo de degradación del antibiótico.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1.- *Aparatos*

El equipo de cromatografía de líquidos está configurado por dos bombas Waters M-6000-A, detector de Diodos LDC SM 5000, inyector automático Kontron 460, conectado a un baño de agua termostatzado y software SM 5000 v. 1.05.

En el ajuste de pH de las muestras y tampones se ha empleado un pH-metro Methrom-Herisau E-520.

## 2.- *Condiciones cromatográficas.*

Fase móvil: tampón K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH = 2,5 y metanol (70:30)

Flujo: 0,9mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Inyección: 10µL

## 3.- *Columna.*

Se ha utilizado una columna analítica Spherisorb ODS-18 de 10 µm (25x0,46 cm) suministrada por Merck, con un número de platos teóricos por metro >80000.

## 4.- *Reactivos.*

El metanol utilizado en la fase móvil es de calidad HPLC suministrado por Scharlau.

Se ha empleado un patrón de Cefprozil comercial, de una riqueza del 98,02 %, valorada por el método yodométrico de la USP, a una concentración de 0,5 mg/mL. Así mismo, se ha utilizado 7-ADCA patrón, suministrado por los laboratorios SKF, para intentar identificar uno de los productos de hidrólisis de la Cefprozil, a una concentración de 1 mg/mL.

Tanto la fase móvil como las muestras se filtran a través de filtros Millipore de 0,22 µ. Los disolventes de la fase móvil se desgasifican empleando una corriente de Helio.

## 5.- *Preparación de los tampones.*

Se han utilizado tampones a valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, preparados según el método de Sørensen (5).

## 6.- *Temperaturas de trabajo.*

Las muestras se han sometido sucesivamente a las temperaturas de ensayo de 30, 40, 50 y 60°C, en un baño termostático.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma obtenido en el ensayo de la Cefprozil, a tiempo inicial, pH = 4 y T = 30°C, se muestra en la figura 1, donde se

manifiestan dos picos cromatográficos; correspondientes a los dos isómeros de éste antibiótico; el pico I de tiempo de retención 1,43 min. y el pico II, de  $tr = 1,66$  min., con el cual realizamos el tratamiento cuantitativo, por ser más estable.

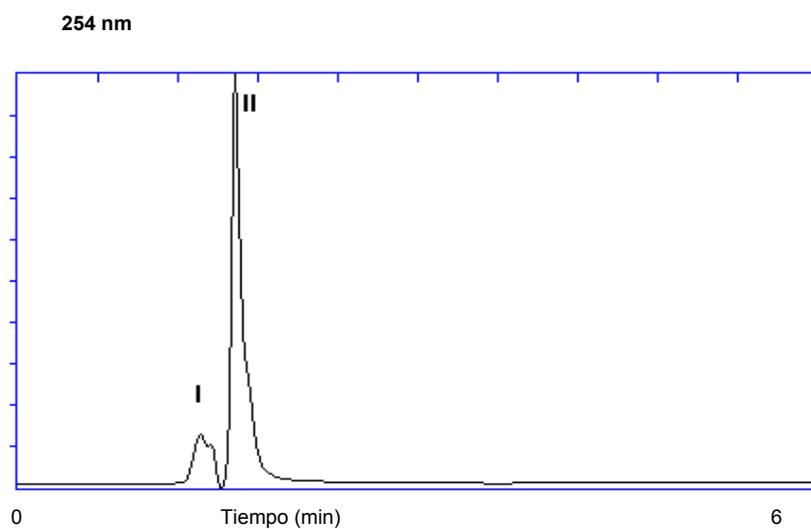


Figura 1: Cromatograma de la Cefprozil a tiempo inicial.  $T = 30^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH} = 4$ , I.  $tr = 1,43$  min. II.  $tr = 1,66$  min.

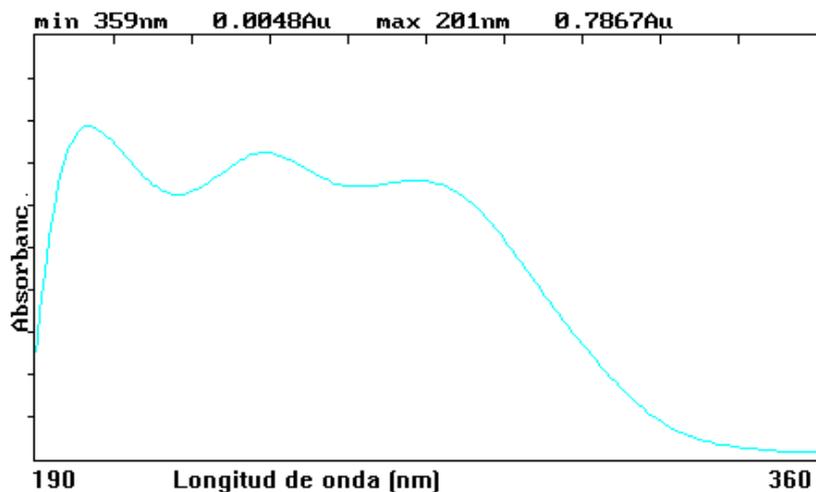


Figura 2: Espectros U.V. de los picos I y II de los isómeros de la Ceftrizoxima en las condiciones de ensayo.

Tanto el pico cromatográfico I como el II, manifiestan un espectro de absorción U.V. con máximos a 280, 240 y 201 nm, tal como se manifiesta en la figura 2.

En los demás valores de pH y temperaturas ensayadas, a tiempo inicial, se dan perfiles cromatográficos idénticos.

A partir de dos horas de degradación, en las mismas condiciones cromatográficas, pH = 4 y T = 30°C, se observa en el cromatograma, la aparición de otro pico cromatográfico, el pico III, de tiempo de retención 1,15 min., tal como se muestra en la figura 3. El espectro U.V. de este último pico (pico III), presenta tres máximos a 279, 239 y 191 nm., como se puede observar en la figura 4; no se manifiesta a tiempo inicial y va aumentando conforme transcurre el tiempo de hidrólisis de la Ceftrizoxima, y se corresponde con el cromatograma y espectro de absorción de un patrón de 7-ADCA, por lo que se debe corresponder con el 7-desmetilADCA, producto de degradación de éste antibiótico, del cual

no hemos podido disponer, pero cuyo espectro y retención cromatográfica, previsiblemente deben ser muy similares al 7-ADCA.

En los distintos valores de pH y temperaturas en los que fue ensayada la degradación de la Cefitoxima, los cromatogramas obtenidos presentan el mismo perfil que el descrito anteriormente.

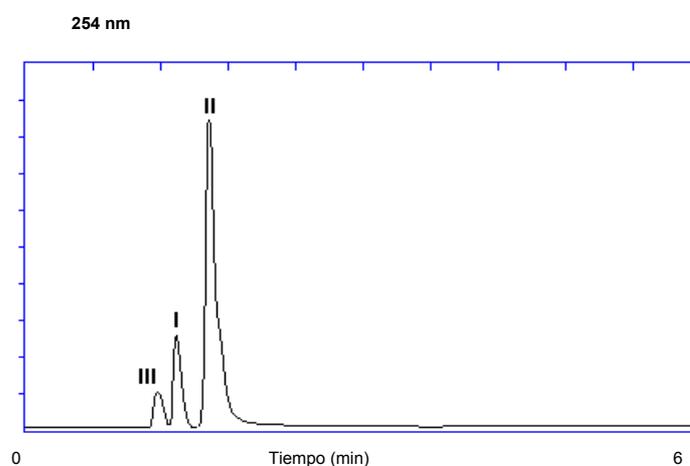


Figura 3: Cromatograma de la Cefitoxima degradada. T = 30°C y pH = 4, I. tr = 1,43 min. II. tr = 1,66 min. III. tr = 1,15 min.

Puesto que en todos los cromatogramas obtenidos se ha registrado la presencia de los mismos productos de hidrólisis podemos deducir que el mecanismo de reacción, en nuestras condiciones de ensayo, es el mismo en todo el intervalo de pH en el que hemos operado y, que debe corresponder a una ruta hidrolítica ácida, tal como se muestra en la figura 5, en la que se reflejan los productos recogidos en el ensayo cromatográfico. Ese mecanismo de reacción, es la ruta de degradación más habitual para las desacetoxicefalosporinas, como la Cefitoxima.

La hidrólisis de la Cefitoxima sigue fundamentalmente, una cinética de orden uno, como se deduce de unos mejores valores del coeficiente de regresión lineal.

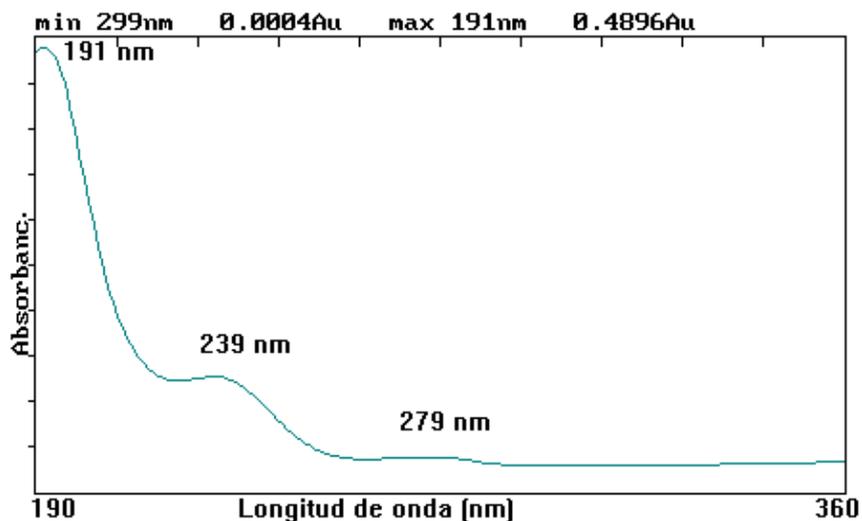


Figura 4: Espectro U.V del pico III.  $t_r = 1,15$  min.  $T = 30^\circ\text{C}$  y  $\text{pH} = 4$ .

Representando el  $\log K_{obs}$  frente a los valores de  $\text{pH}$  obtenemos un perfil característico de una reacción de hidrólisis (Figura 6), donde se pueden observar dos puntos de inflexión. Según se deduce de la gráfica de la figura 6, la degradación es máxima en los valores de  $\text{pH}$  más ácidos (2-3), con un punto de inflexión a  $\text{pH} = 4$ , donde la degradación de la Ceftrizoxima es menor, para aumentar en el  $\text{pH} 5$  y volver a disminuir, hasta alcanzar el mínimo valor a  $\text{pH} 8$ .

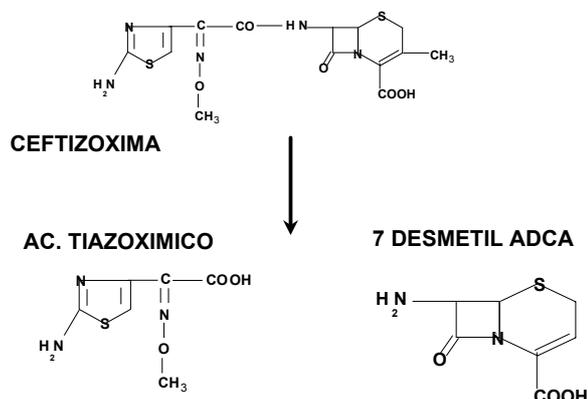


Figura 5: Ruta propuesta de hidrólisis de la Cefprozil.

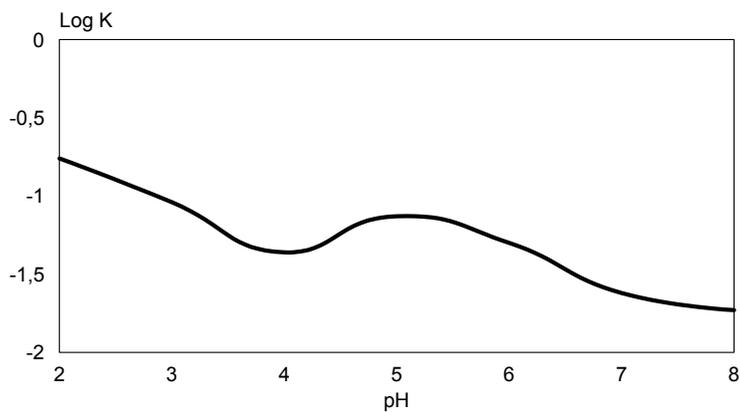


Figura 6: Representación del log  $K_{obs}$  frente al pH a  $T = 30^{\circ}\text{C}$ .

Las influencia de la temperatura, viene dada por la ecuación de Arrhenius, en los distintos valores de pH. La Energía de Activación de Arrhenius, sigue un orden de pH:

$$\text{pH} = 2 < 3 < 5 < 6 < 4 < 7 < 8$$

según se observa en la Tabla I.

TABLA I  
*Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (Kcal/mol)*

<b>PH</b>	<b>Ea</b>
2	54,33
3	56,59
4	59,98
5	57,43
6	59,34
7	63,17
8	64,61

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) KUCHINSCAS, E. J, LEVY, G. N. (1977) *J. Pharm. Sci.* 61: 727-9.
- (2) VAN KRIMPEN, P. C, VAN BENNEKOM, W. P. (1987) *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition.* 9: 1-23.
- (3) HOU, J. P, POOLE, J. W. (1969) *J. Pharm. Sci.* 58, 4 447-454.
- (4) DOADRIO, A. L, IRIBARREN, M. (1990) *An. Real. Acad. Farm.* 56: 9-19.
- (5) MERCK. Tabla de tampones .

## **Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica**

M<sup>a</sup> DEL CARMEN DE LA ROSA, CARLOS ULLÁN, M<sup>a</sup> PILAR PRIETO Y M<sup>a</sup> ANGELES MOSSO.

*Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 28040.*

### RESUMEN

Se ha realizado el análisis microbiológico del aire de una zona limpia de envasado aséptico de materias primas en una industria farmacéutica con el fin de determinar los niveles y los tipos de microorganismos presentes. Se tomaron 569 muestras en siete puntos de la zona limpia durante 18 meses, mediante los métodos de gravedad e impacto (Biotest RCS Plus). La media del número de bacterias y hongos obtenidos fueron 2,4 y 2,7 ufc/30 min por el método de gravedad y 13 y 1,1 ufc / m<sup>3</sup> por el método de impacto, respectivamente. Se han encontrado más muestras con bacterias (51%) que con hongos (33%), predominando los cocos sobre los bacilos y los mohos sobre las levaduras. No se han detectado bacterias Gram negativas. Los géneros bacterianos más frecuentes han sido: *Staphylococcus* (27,4 %), *Micrococcus* (9,7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7,4%) y *Arthrobacter* (6,7%) y los de hongos: *Penicillium* (7,2%), *Curvularia* (6,3%) y *Aspergillus* (4,4%). La calidad microbiológica de la zona limpia ha sido elevada ya que todas las muestras han cumplido los límites de grado C y el 32% los de grado A establecidos por la Unión Europea.

**Palabras clave:** Calidad microbiológica. Aire. Zona limpia.

### SUMMARY

#### **Air microbiological quality in a clean area from a pharmaceutical industry**

Microbiological analysis of the air from a clean area used for aseptic packing of raw materials in a pharmaceutical industry has been carried out in order to determine the

microbiological levels and to identify those microorganisms present in the air. 569 samples were taken from seven different points of the clean area during 18 months, using gravity and impact (Biotest RCS Plus) methods. The average number of bacteria and fungi obtained when using the gravity method was 2.4 and 2.7 ufc/ 30 min ; 13 and 1.1 ufc/m<sup>3</sup> using the impact method. We have obtained more samples with presence of bacteria (51 %) than fungi (33%) and a prevalence of cocci over rods and molds over yeasts. Gram negative bacteria were not detected. The most frequently bacterial genera were *Staphylococcus* (24.7%), *Micrococcus* (9.7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7.4%) and *Arthrobacter* (6.7%) and the molds were *Penicillium* (7.2%), *Curvularia* (6.3%) and *Aspergillus* (4.4%). There is a good microbiological quality in this clean area and all the samples reached a class C limit and the 32% at the class A as established by the European Union.

**Key words:** Microbiological quality. Air. Clean area.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentes en el aire del interior de los edificios (casas, escuelas, hospitales) pueden proceder del hombre, del aire exterior, polvo, madera, pintura, papel, humidificadores y otros, y han sido estudiados desde hace tiempo (24, 31). El grado de contaminación microbiana en estos ambientes está influenciado por factores tales como la frecuencia de ventilación, el número de personas presentes en la sala y la naturaleza y grado de las actividades que realizan los individuos dentro de los locales.

En las industrias también han sido estudiados los microorganismos del aire por su interés sanitario o por la alteración que pueden causar en los productos que en ellas se fabrican. Las industrias en las cuales la contaminación del aire tiene una mayor importancia son las farmacéuticas, alimentarias y de electrónica (10, 13). De todas ellas, la industria farmacéutica es la que requiere un mayor control microbiológico del ambiente, ya que los medicamentos pueden contaminarse durante su fabricación por el aire, equipos, superficies de trabajo o el personal.

Desde hace tiempo la industria farmacéutica debe cumplir unas Normas de Correcta Fabricación que garanticen la calidad microbiológica de los medicamentos (1, 3). La presencia y crecimiento de microorganismos en productos ya terminados, puede ocasionar riesgo para la salud, o bien alterar las características físico-químicas que impedirían su comercia-

lización. Por esta razón todas las zonas de producción deben mantenerse en unas condiciones higiénicas muy estrictas, con niveles mínimos de microorganismos y partículas que se denominan “zonas limpias”.

Uno de los aspectos que contemplan las guías de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos, es el control microbiológico ambiental, tanto del aire como de las superficies en distintos puntos: almacenes, zonas de producción y laboratorios de control de calidad microbiológico. Según las características requeridas, las zonas limpias se clasifican en diversos grados que son equivalentes en todos los países. La Unión Europea considera los grados A, B, C y D cuyos límites de microorganismos por m<sup>3</sup> de aire son, respectivamente, menos de 1, 5, 100 y 500.

El objeto de este trabajo ha sido determinar la calidad microbiológica del aire de una zona limpia de envasado aséptico de materias primas en una industria farmacéutica, con el fin de definir los niveles de contaminación máxima para esta zona, en función del riesgo del producto, siguiendo los criterios establecidos por las normativas para la industria farmacéutica. Los datos obtenidos en este estudio nos servirán como referencia para establecer unos límites propios de alerta y de acción que si se exceden, llevará a la industria a poner en marcha los métodos de control microbiano necesarios en cada caso. Así mismo, la identificación de los microorganismos que aparecen con más frecuencia nos llevará a saber su posible origen y tomar las medidas necesarias para evitar su entrada en la zona limpia, así como permitirá una desinfección más correcta.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo.** Las muestras se tomaron en un total de siete puntos distintos de la zona limpia de envasado de materias primas: 1, 2 y 3 (área de envasado y pesado), 4 (vestuario), 5 y 6 (esclusa de entrada y salida de materiales), y 7 (área de envasado y pesado). Los controles microbiológicos se realizaron desde el mes de Octubre de 1996 hasta el mes de Mayo de 1998. Se tomaron 89 muestras de los puntos 1, 2, 3, 4, 5, y 6; además de 35 muestras del punto 7, haciendo un total de 569.

**Recuento de microorganismos.** Se utilizó el método de gravedad para el

análisis microbiológico del aire en los puntos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Se usaron placas Petri con agar triptona soja (TSA) (5) para la detección y aislamiento de las bacterias mesófilas. Las placas se depositaron en el suelo en los puntos anteriormente descritos, abiertas en toda su superficie durante treinta minutos, y después se incubaron a 30° C durante tres días. Para el recuento y posterior aislamiento de los hongos se utilizaron placas Petri con agar Sabouraud con cloranfenicol (5), incubando durante seis días a 22-24° C. Los resultados se expresaron como ufc/30 min.

Para el método de impacto se utilizó el muestreador centrífugo *Bio-test RCS Plus Sampler*. La muestra se tomó en el centro de la sala de envasado (punto 7), y se recogió la cantidad de 0,5 m<sup>3</sup> de aire a una velocidad de 40 l/min. El número de microorganismos por volumen de aire se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Microorganismos/ m}^3 \text{ de aire} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias} \times 25}{\text{tiempo (min)}}$$

Para el recuento y aislamiento de las bacterias, se utilizaron tiras con TSA, incubando a 30° C durante tres días. Para el recuento y aislamiento de los hongos, se utilizaron tiras con agar rosa de Bengala (22), incubando durante seis días a 22-24° C. Los resultados se expresaron en ufc/m<sup>3</sup>

**Identificación de microorganismos.** Se tomaron las tres colonias más representativas de cada placa, o todas las colonias si el número era inferior a tres, anotando las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas.

La identificación de las bacterias se realizó mediante las siguientes pruebas: Morfología de la colonia y producción de pigmento, tinción de Gram, catalasa, oxidasa y oxidación/ fermentación de la glucosa (9). Además para la identificación de las cepas de cocos Gram positivos se utilizó el sistema miniaturizado API Staph (bioMérieux) y para *Staphylococcus aureus* se hizo la prueba de aglutinación Slidex Staph-Kit (bioMérieux). Para la identificación de las cepas de bacilos Gram positivos, se hicieron las pruebas citadas anteriormente y además la tinción de esporas. Las cepas de bacilos no esporulados se identificaron mediante el sistema miniaturizado API Coryne (bioMérieux).

Los hongos filamentosos se han identificado por la morfología de las colonias y por la observación microscópica de las hifas y formas de

reproducción, por la técnica de la cinta adhesiva y por microcultivos (18). Las levaduras se han identificado por la morfología de las colonias en medio sólido, observación microscópica y por las pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizando el sistema miniaturizado API 20 C AUX (bioMérieux).

Para la clasificación de las cepas bacterianas se han utilizado los criterios del Manual de Bergey's (15, 19, 28). Para las levaduras, se utilizaron los criterios de Barnett *et al* (8), y las cepas de mohos se clasificaron siguiendo los criterios de Onions *et al* (26) y de Barnett y Hunter (7).

## RESULTADOS

**Evolución mensual del número de microorganismos por los métodos de gravedad e impacto.** La evolución mensual del número de bacterias y hongos por el método de gravedad, se especifica en las tablas 1 y 2, respectivamente. El valor medio más alto de bacterias se obtuvo en el mes de Septiembre debido a un aumento esporádico en el punto 5 (esclusa de entrada de materiales). También en este mes aparecen en este punto, valores más altos de hongos de los habituales, aunque el valor medio mayor se obtuvo en el mes de Diciembre de 1997 debido al punto 6 (esclusa de salida). La media del número de bacterias y hongos obtenidos en las distintas muestras fue de 2,4 y 2,7 ufc/30 min, respectivamente. La esclusa de entrada de materiales es el punto que ha presentado el valor medio más alto de bacterias, 4,6 y la esclusa de salida el más alto de hongos, 7,6. En la zona de envasado el número medio de bacterias y hongos determinado por el método de impacto fue de 13 y 1,1 ufc /m<sup>3</sup>. Los meses de Septiembre y Octubre fueron en los que se detectaron mayor número de bacterias por m<sup>3</sup> y en Noviembre el mayor número de hongos (Figura 1).

TABLA 1  
*Evolución mensual del número de bacterias . Método de gravedad (ufc/30 min).*

AÑO	MESES	Puntos de muestreo						X
		1	2	3	4	5	6	
1996	Octubre	1,2	0,5	0,4	2,6	1,4	0,8	1,1
	Noviembre	0,7	1,4	2	5,1	1,1	1,3	1,9

1997	Diciembre	0,5	1,2	0,8	3,7	0,6	1,2	1,3
	Enero	1,2	0,7	0,3	4,1	7,8	0,7	2,4
	Febrero	0,3	1,3	0,3	0	0	2,3	0,7
	Marzo	16,5	5	7,5	4,5	1,5	2	6,1
	Abril	1	1,2	0,2	4,5	0,7	0,7	1,4
	Mayo	0	0	0	1	0	0	0,2
	Junio	1,2	1,2	1,5	0,2	0,2	2,7	1,2
	Julio	0	11,5	0,5	1	2	3	3,0
	Septiembre	0	3	1,5	1,5	48	1	9,2
	Octubre	9,7	1,7	1,2	2	1,5	2,7	3,1
	Noviembre	0,3	2,3	1,3	1	1	1	1,2
	Diciembre	1	1	0	0,5	0	0	0,4
1998	Enero	0,5	0,2	15	2	0,5	0,5	3,1
	Febrero	0,2	0,2	2	0,5	17	1,2	3,5
	Marzo	0,6	1,6	0,8	1,2	0,8	0,6	0,9
	Abril	8	1	2	1,2	0,3	1	2,3
<b>TOTAL (X)</b>		2,4	1,9	2,1	2,1	4,6	1,3	2,4

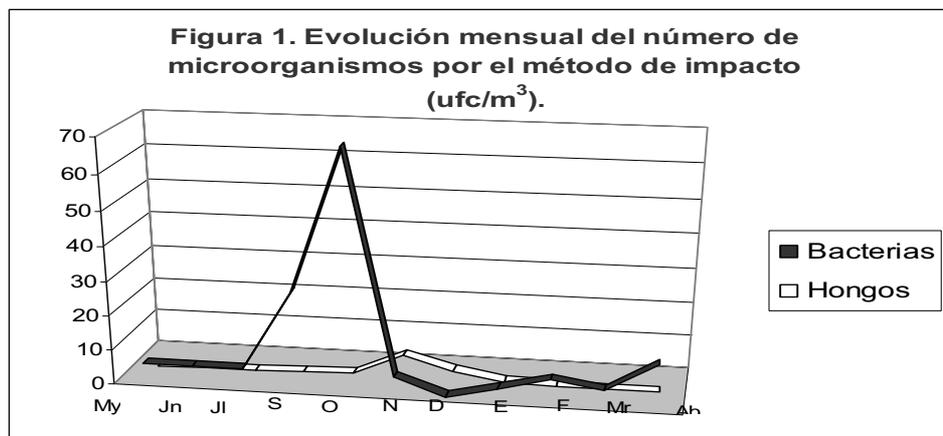
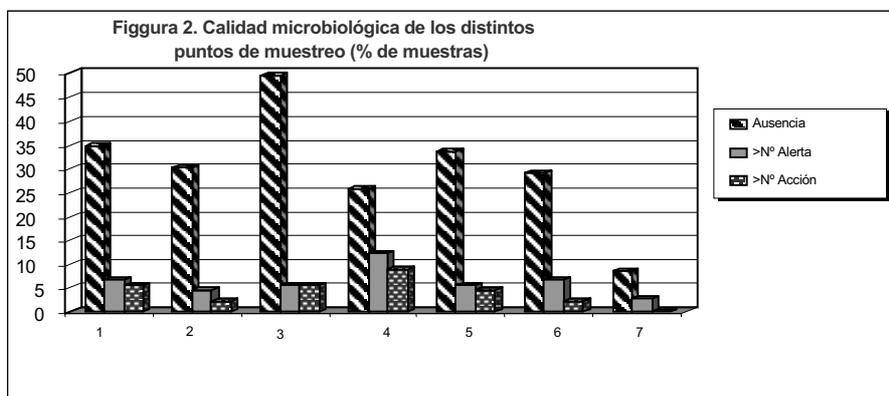


TABLA 2  
Evolución mensual del número de hongos. Método de gravedad ( $ufc/30min$ ).

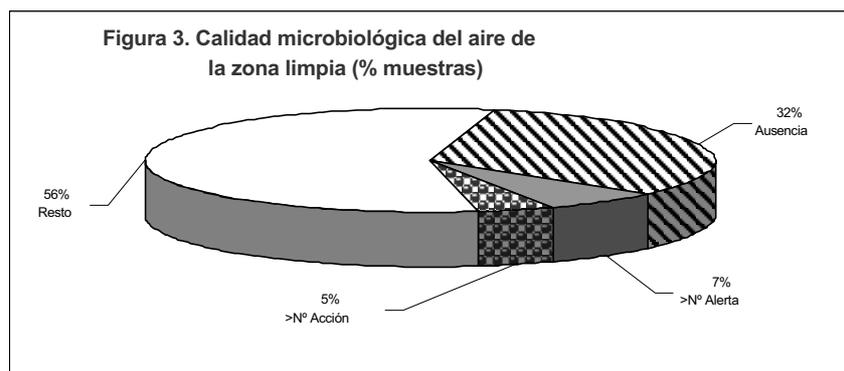
AÑO	MESES	Puntos de muestreo						X
		1	2	3	4	5	6	
1996	Octubre	0,3	0,4	0,2	0,5	1,3	0,3	0,5
	Noviembre	3,1	1,5	1,3	1,5	1,1	3,6	2,0

	Diciembre	0,3	0,4	0,7	1,2	1,3	0,9	0,8
1997	Enero	0,4	0,6	0,1	0,7	0,9	1	0,6
	Febrero	0	0	0,3	0,3	0	0,3	0,1
	Marzo	0,5	0,5	0	4,5	0,5	0,5	1,1
	Abril	0	0,2	0,2	0,8	0	0	0,6
	Mayo	0	1	0	0	0	1	0,3
	Junio	0,5	0,2	0,2	0	1	0	0,3
	Julio	0,5	0	0,5	0	0	0	0,2
	Septiembre	18,5	0	2,5	0,5	30	1	8,7
	Octubre	0	0,4	0,2	0,4	1,2	1,2	0,6
	Noviembre	0,3	0,3	0,3	0,7	0	1	0,4
	Diciembre	4	5,5	26	17	8,5	122	30,5
	1998	Enero	0,5	0,5	0,2	1	0	0,2
Febrero		0	0	0	0	0,2	0,2	0,1
Marzo		0	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2
Abril		0,3	0,3	0,3	6	2	3,3	2,0
	<b>TOTAL (X)</b>	1,5	0,6	1,8	2,0	2,6	7,6	2,7

**Calidad microbiológica del aire de la zona limpia.** La calidad microbiológica de los distintos puntos de muestreo se ha evaluado determinando el número y porcentaje de muestras que presentaron ausencia de cualquier tipo de microorganismos (bacterias y hongos), así como las muestras que han superado los niveles de alerta y de acción establecidos previamente y que fueron, respectivamente, 8 y 12 ufc/30 min por el método de gravedad y 100 y 200 ufc /m<sup>3</sup> por el método de impacto. Para determinar estos niveles se ha tenido en cuenta los criterios de las Normas de Correcta Fabricación para zonas limpias (3) y las recomendaciones de AEFI (4), así como datos experimentales previos. En la figura 2 se expone el número de muestras de cada punto incluidas en estas categorías.



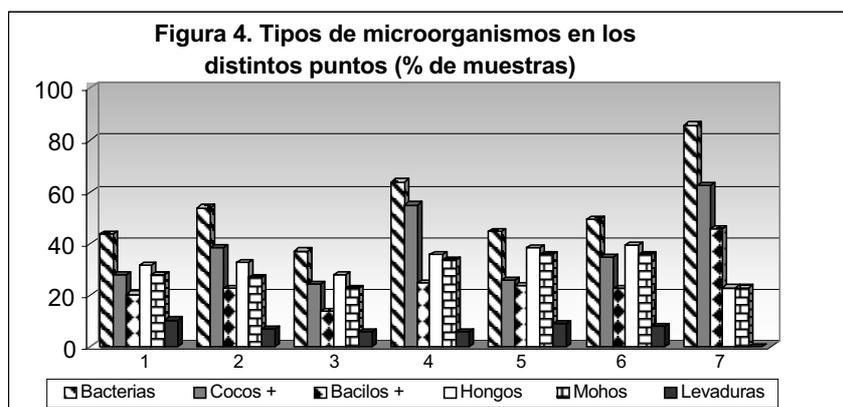
Los resultados obtenidos por los dos métodos utilizados nos indican que la calidad microbiológica ha sido buena, ya que en el 32 % de las muestras no se detectó ningún tipo de microorganismo y sólo el 7% y el 5 % superaron, respectivamente, los niveles de alerta y acción previamente establecidos (Figura 3). En el área de envasado, por el método de impacto, sólo una muestra superó el nivel de acción y ninguna el nivel de alerta y el 95% de las muestras presentaron menos de 20 ufc /m<sup>3</sup>. En esta misma zona por el método de gravedad, el 95% de las muestras presentaron menos de 7 ufc /30 min. Por tanto, todas las muestras han cumplido los límites del aire de zonas limpias de grado C e incluso el 32% está dentro de los límites establecidos para el grado A (3).



**Tipos de microorganismos.** Los resultados se exponen en las figu-

ras 4 y 5. Se han detectado mayor número de muestras con bacterias que con hongos por los dos métodos. Se han encontrado bacterias en el 51% y hongos en el 33%, siendo mayor la proporción de muestras con cocos Gram positivos que con bacilos Gram positivos y con mohos que con levaduras (Figura 5). No se encontraron bacterias Gram negativas en ninguna muestra. Por el método de gravedad, la zona del vestuario (punto 4) ha sido la que ha presentado un mayor número de muestras con bacterias, principalmente cocos Gram positivos, no encontrándose diferencias significativas en relación con los hongos, en los distintos puntos de muestreo. Por el método de impacto, la mayoría de las muestras presentan bacterias (85,7%) siendo menor el de las que tienen hongos (22,8%).

Los géneros de bacterias más frecuentemente aislados fueron : *Staphylococcus* (27,4%), *Micrococcus* (9,7%), *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7,4%) y *Arthrobacter* (6,7%). Todos estos géneros se han encontrado en todos los puntos tanto por el método de gravedad como por el método de impacto (Figura 6 ). Las especies de *Staphylococcus* identificadas han sido : *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. warnerii*, *S. auricularis* y *S. saprophyticus*, siendo la especie predominante *S. epidermidis*. Las especies de *Micrococcus* se han identificado como *M. luteus* y *M. varians* predominando la primera.

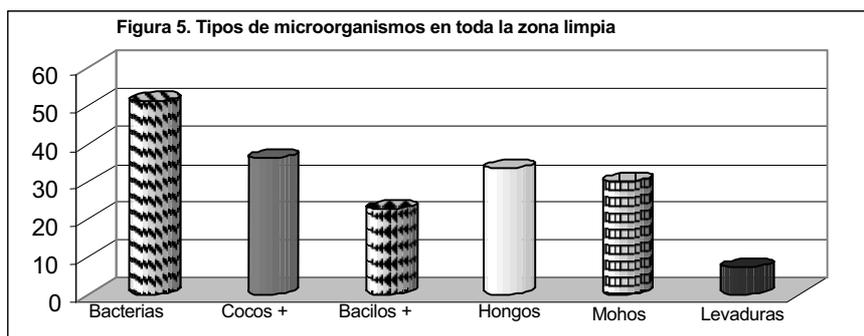


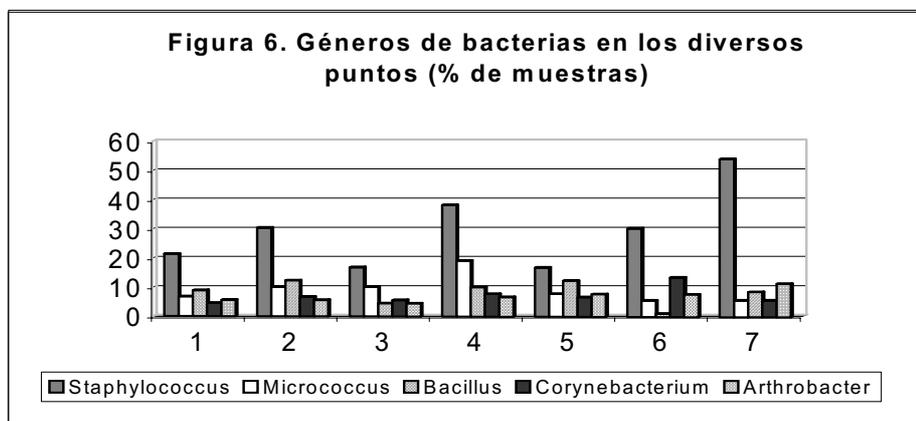
Los géneros de mohos aislados en los distintos puntos se encuentran en la tabla 3. Las muestras han presentado una gran variedad de hongos, principalmente mohos, siendo los más frecuentes : *Penicillium*

(7,2%), *Curvularia* (6,3%), *Aspergillus* (4,4%), *Alternaria* (2,8%), *Cladosporium* (2,6%) y *Paecilomyces* (2,4%) . Los géneros de levaduras identificados han sido: *Rhodotorula*, *Candida* y *Criptococcus*. Por el método de impacto se han detectado muy pocas muestras con hongos, sólo cuatro géneros de mohos diferentes y ninguna levadura.

### DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es elaborar productos con una elevada calidad microbiológica que no se contaminen con los microorganismos presentes en el aire de las zonas de producción por lo cual es necesario disponer de unas zonas limpias. Para cumplir este objetivo hay que realizar en estas zonas, un control de los microorganismos por métodos físicos o químicos y validar la eficacia de estos procesos por métodos microbiológicos.





No existe un método de muestreo de aire ideal, por lo que para elegir uno deberemos considerar qué queremos investigar, si nos interesa saber el número total de microorganismos o el de viables y su identificación. En función de estas premisas elegiremos el más adecuado, por lo que es muy frecuente la utilización de varios métodos. En este trabajo se han utilizado dos métodos : gravedad e impacto.

El método de gravedad es uno de los más antiguos, pero sigue siendo de gran utilidad (16), ya que permite identificar los microorganismos viables de los cultivos,. Sin embargo no es cualitativa ni cuantitativamente exacto porque detecta, principalmente, los microorganismos que más persisten en el aire y de mayor tamaño, por lo que se recomienda para zonas sin turbulencias. Permite conocer la distribución de los microorganismos, que no se obtiene con los muestreadores de aire forzado, para lo cual es necesario tomar muestras en distintos puntos de la zona que se controla (4).

TABLA 3  
*Géneros de mohos en los diversos puntos (nº de muestras)*

GÉNEROS	PUNTOS							TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	
Acremonium	-	-	-	-	1	-	-	1
Alternaria	4	2	1	-	5	3	1	16
Aspergillus	1	2	2	2	6	10	2	25
Aureobasidium	-	-	-	-	-	1	-	1

Cladosporium	2	2	3	2	3	3	-	15
Curvularia	4	4	3	9	6	10	-	36
Drecheslera	-	-	-	1	-	-	-	1
Exophiala	-	-	-	1	-	-	-	1
Fusarium	-	1	-	2	-	-	-	3
Geomyces	-	1	-	-	-	-	-	1
Geotricum	1	-	1	-	-	2	-	4
Gliocladium	-	-	1	-	-	-	-	1
Helminthosporium	-	1	1	1	1	-	-	4
Humicola	-	-	-	-	-	2	-	2
Memnoniella	1	-	-	-	-	-	-	1
Micelia sterilia	2	2	4	-	-	-	-	8
Monilia	2	-	-	-	-	-	-	2
Mucor	-	1	-	1	2	1	1	6
Paecilomyces	2	2	1	4	2	3	-	14
Papulospora	-	-	-	-	1	-	-	1
Penicillium	4	5	6	6	6	10	4	41
Ulocladium	-	-	1	1	-	1	-	3
Verticillium	-	-	-	1	-	-	-	1

El método de impacto sobre superficies sólidas es uno de los más usados en la actualidad y se han diseñado una gran variedad de aparatos (12). En este método los microorganismos se separan de la corriente de aire utilizando la inercia para forzar su sedimentación. El aparato empleado en este estudio, RCS Plus se basa en este principio pero utiliza la fuerza centrífuga para separar las partículas de una manera radial. Tiene la ventaja de ser fácilmente manejable y portátil, y se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica habiendo sido recomendado por la FDA (2) y varios autores revisados por Kaye (17).

La calidad microbiológica de esta zona limpia de envasado de materias primas apirógenas ha sido buena ya que el número de microorganismos obtenidos por los dos métodos ha sido bajo y sólo un porcentaje muy pequeño de muestras superó los niveles de alerta y de acción. Esto demuestra una gran eficacia del programa de limpieza, desinfección y control microbiológico. Los puntos de mayor riesgo fueron las esclusas de entrada y salida de materiales que presentaron una contaminación esporádica en algunos meses pero los microorganismos aportados por estos pun-

tos a la zona de envasado no fue significativa.. El aumento del número de microorganismos pudo ser debido al material de acondicionamiento y a las condiciones climáticas.

Los resultados obtenidos indican que podría disminuirse el nivel de alerta de la zona de envasado a 7 ufc/30 min y 20 ufc/m<sup>3</sup>, respectivamente, según se utilice el método de gravedad o el de impacto ya que el 95% de las muestras analizadas presentan un número menor (27).

Los datos obtenidos por el método de gravedad son semejantes a los encontrados por Pascual (27) en zonas de llenado aséptico. Por el método de impacto la contaminación microbiana de la zona de envasado ha sido menor que la encontrada en zonas limpias de la industria farmacéutica (27) y aeronáutica (14) y en zonas con ambiente controlado (21).

Algunos autores han señalado la dificultad de comparar los resultados obtenidos por el método de gravedad con los métodos cuantitativos (11). Estudios experimentales realizados han encontrado que por el método de gravedad se detecta alrededor de un 10 % de los microorganismos presentes en el aire (27). Nuestros resultados confirman estos datos cuando se compara el número de bacterias pero no en el de hongos que ha sido inferior en el método de impacto, lo que puede deberse al empleo de rosa de Bengala como agente selectivo que retarda el crecimiento de los mohos y afecta a las levaduras fotosensibles (6).

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, sin embargo no existe una población microbiana autóctona. La presencia de uno u otro tipo depende del origen (suelo, agua y seres vivos) y de su supervivencia. En nuestro estudio han predominado las bacterias a los hongos, siendo los cocos Gram positivos los más frecuentes. Estas bacterias forman parte de la micropoblación normal del hombre y pueden pasar al aire por las actividades realizadas en esta zona. La proporción de muestras con microorganismos esporulados ha sido baja a pesar de su mayor supervivencia. Estos microorganismos proceden del suelo por lo que debido a los controles que se realizan en estas zonas su número es pequeño. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores en zonas controladas (14, 21). No se han detectado bacterias Gram

negativas debido, seguramente, a su menor supervivencia ya que son muy sensibles a la desecación, temperatura y desinfectantes (25).

El género *Staphylococcus* ha sido el predominante en todos los puntos, principalmente en el vestuario, siendo *S. epidermidis* la especie más frecuente lo que confirma el origen humano de esta contaminación. También en estudios realizados por la FDA se ha encontrado que el 80% de la contaminación de estas zonas se debe al personal (4). En mucha menor proporción se ha encontrado *S. aureus*, aunque también procede del hombre, su presencia es menor y tiene menos resistencia fuera de su hábitat natural (25).

Otras bacterias encontradas han sido diversas especies del género *Micrococcus* predominando *M. luteus*. Este microorganismo de origen humano o animal es frecuente en el aire por su gran supervivencia ya que posee pigmentos carotenoides que son fotoprotectores (23) y además se ha comprobado su mayor resistencia al impacto sobre medios sólidos (29).

Los bacilos esporulados detectados pertenecen al género *Bacillus*. Proceden del suelo y se encuentran frecuentemente en el aire exterior (30) siendo menor su presencia en ambientes controlados por lo comentado anteriormente (14). También se han detectado bacilos Gram positivos, pleomórficos, denominados “corineformes” (*Corynebacterium*, *Arthrobacter*). Estas bacterias de origen tanto humano como del suelo se han encontrado frecuentemente en el aire exterior (30) y en zonas limpias (14). Estos microorganismos aunque no son esporulados tienen una gran supervivencia por la composición de su pared celular, rica en lípidos (28).

Se han detectado más mohos que levaduras en todos los puntos de muestreo, debido a que son muy ubicuos y a la mayor resistencia de sus esporas a la desecación (32). Se ha encontrado un número muy bajo pero una gran diversidad de géneros de mohos, semejantes a los encontrados en el aire exterior (20). Los géneros detectados más frecuentemente (*Penicillium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Paecilomyces*) predominan en el aire exterior y en el interior (4, 32). Todos ellos pertenecen al grupo de los Deuteromicetos cuyas esporas asexuales son captadas fácilmente por los muestreadores de aire y crecen bien en los

medios sólidos empleados. No hay unanimidad en qué género es el predominante en ambientes cerrados lo que puede ser atribuido a las diversas técnicas de muestreo, medios de aislamiento, temperaturas de incubación y las diversas zonas geográficas (32).

Por el método de impacto se ha encontrado una menor diversidad de géneros de mohos y no se han detectado levaduras en ninguna muestra, lo que puede deberse al efecto que sobre estos microorganismos ejerce el impacto sobre las superficies de los medios, a los agentes selectivos de los mismos y a la desecación. El género de levaduras más frecuente ha sido *Rhodotorula* que posee un pigmento rosa fotoprotector por lo que se encuentra con frecuencia en el aire (30).

Por los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la contaminación microbiana de la zona de envasado, fundamentalmente de origen humano, ha sido baja, cumpliendo los límites de las zonas limpias de grado C e incluso un número alto de muestras cumplió los límites establecidos para el grado A por las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de la Comunidad Europea (3), al no detectarse ningún tipo de microorganismo. Se ha confirmado la conveniencia de utilizar dos métodos distintos de muestreo para obtener un mejor conocimiento, no sólo del número de microorganismos sino de su diversidad y localización en estas zonas.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANÓNIMO. 1985. B.O.E. 30-4-1985, **103**, 11997-12000.
- (2) ANÓNIMO. 1987. Food and Drug Administration. Guidelines on sterile drugs products. Fed. Std. 209 c.
- (3) ANÓNIMO. 1992. Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de la Comunidad Europea. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- (4) ANÓNIMO. 1996. Programa de control microbiológico ambiental en zonas de producción. Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Madrid.
- (5) ANÓNIMO. 1997. Real Farmacopea Española. 1ª Edic. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

- (6) BANKS, J.G., BOARD, R.G., CARTER, J. and DODGE, A.D. 1985. *Journal of Applied Bacteriology*, **58**, 391-400.
- (7) BARNETT, H.L. and HUNTER, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Burgess publishing company, Minneapolis.
- (8) BARNETT, H.L.; PAYNE, R.W. and YARROW, D. 1983. Yeasts: Characteristics and identification. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (9) BARROW, G.I and FELTHAM, R.K.A. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (10) BLOMQUIST, G.; STROM, G. and STROMQUIST, L.H. 1984. *Scandinavian Journal Work Environmental Health*, **10**, 109-113.
- (11) BUTTNER, M.P. and STETZENBACH, L. 1993. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 219-226.
- (12) BUTTNER, M.P.; WILLEKE, K. and GRINSHHPUN, S.A. 1997. Sampling and analysis of airborne microorganisms. En: Hurst, C. *et al* (ed). Manual of environmental microbiology. Ed. ASM Press, Washington.
- (13) EDUARD, W.; LACEY, J.; KARLSSON, K.; PALMGREN, U.; STROM, G. and BLOMQUIST, G. 1990. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **51**, 427-436.
- (14) FAVERO, M.S.; PULEO, J.R.; MARSHALL, J.H. and OXBORROW, G. 1966. *Applied Microbiology*, **14**, 539-551.
- (15) HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (16) JUOZAITIS, A.; WILLEKE, K.; GRINSHHPUN, S.A. and DONNELLY, J. 1994. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 861-870.
- (17) KAYE, S. 1988. *Journal of Parenteral Science and Technology*, **5**, 147-152.
- (18) KONEMAN, E and ROBERTS, G. 1987. *Micología práctica de laboratorio*. 3ª Edic. Ed. Panamericana, Argentina.
- (19) KRIEG, R.N. and HOLT, G.J. 1984. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. I. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (20) LEVETIN, E. 1991. *Grana* **30**, 123-128.
- (21) LJUNGQVIST, B. and REINMÜLLER, B. 1998. *European Journal of Parenteral Sciences*, **3**, 59-62.
- (22) MARTIN, J.P. 1950. *Soil Science*, **69**, 215-232.

- (23) MATHEWS, M.M. and SISTROM, W.R. 1959. *Nature*, **184**, 1892-1895.
- (24) MIQUEL, P. et CAMBERT, R. 1901. *Traité de bacteriologie pure et appliqueé*. Ed. Masson y Cia., París.
- (25) MOHR, A.J. 1997. Fate and transport of microorganisms in air. En: Hurst, C. *et al* (ed). *Manual of environmental microbiology*. Ed. ASM Press, Washington.
- (26) ONIONS, H.S.A.; ALLSOPP, D. and EGGINS, H.O. 1981. *Smith's introduction to industrial Microbiology*. 7ª Edic. Ed. Edward Arnold, London.
- (27) PASCUAL, P. 1989. *Estudio técnico-práctico para la cualificación y validación de sistemas y procesos en áreas estériles*. Monografía. Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Madrid.
- (28) SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E and HOLT, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol II. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- (29) STEWART, S.L.; GRINSHPUN, S.A.; WILLEKE, K.; TERZIEVA, S.; ULEVICIUS, V. and DONNELLY, J. 1995. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1232-1239.
- (30) UNDERWOOD, E. 1992. Ecology of microorganims as it affects the pharmaceutical industry. En: Hugo, W.B. and Russell, A.D. (ed.) *Pharmaceutical microbiology*. 5ª Edic. Ed. Blackwell Scientific Publication, London.
- (31) WELLS, W. F. 1933. *American Journal of Public Health*, **23**, 58-99.
- (32) YANG, CH. and JOHANNING, E. 1997. Airborne fungi and mycotoxins. En: Hurst, C.J. *et al.* (ed). *Manual of environmental microbiology*. Ed. ASM. Washington.

## **Carboxilatos hidroxilados de rodio II (gluconato, lactobionato e lactato). Síntesis, caracterización y ensayos de citotoxicidad *in vitro***

E. S. GIL<sup>1</sup>, E. I. FERREIRA<sup>1</sup>, A. C. VALDERRAMA<sup>2</sup>, S. B. ZYNGIER<sup>3</sup>  
Y R. NAJJAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Sao Paulo (USP),  
SP - Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto de Química (USP), SP - Brasil.*

<sup>3</sup>*Intituto de Ciências Biomédicas (USP), SP - Brasil.*

### RESUMEN

Son descritos la síntesis, la caracterización y los ensayos biológicos de dos nuevos Carboxilatos de Rodio derivados de carbohidratos: gluconato y lactobionato de rodio (II). Estos compuestos mostraron una buena solubilidad en agua y baja toxicidad *in vivo* en ratones (hembras) a dosis mayores de 200 mg/kg. La actividad citostática fue evaluada en células K-562 y comparada con otro carboxilato hidroxilado, como el lactato de rodio, Rh<sub>2</sub>(Lac)<sub>4</sub>, el cual fue recientemente descrito y sintetizado por una ruta alternativa. La actividad antitumoral de los derivados de carbohidratos fue baja, sin embargo por la baja toxicidad los carboxilatos son prometedores como portadores de fármacos antineoplásicos que pueden formar aductos en posición axial.

**Palabras claves:** Rodio.- Carboxilatos.- Carbohidratos.- Anticancerígenos.

## SUMMARY

**Rhodium (II) hydroxyl carboxylates (rhodium gluconate, lactobionate and lactate).  
Synthesis, characterization and *in vitro* cytostatic assays**

The synthesis, characterization and biological assays of two new rhodium carboxylates carbohydrate derivatives, rhodium gluconate  $Rh_2(Gli)_4$  and lactobionate  $Rh_2(Lab)_4$  are herein described. These compounds showed good water solubility and low toxicity for female mice in doses higher than 200 mg/kg. The cytostatic activity was carried out *in vitro* against K-562 cells and compared with other hydroxyl carboxylate, the rhodium lactate  $Rh_2(Lac)_4$ , which was recently described and synthesized in our laboratory by an alternative route. The derivatives showed low *in vitro* activity but due to the low toxicity they can be considered as promising carboxylate carriers of antineoplastic drugs that can form adducts in the axial positions.

**Key words:** Rhodium.-Carboxylates.-Carbohydrates.-Antineoplastic agents

## INTRODUCCIÓN

Desde que Rosenberg y col. [1-3] introdujeron a la cisplatina en la terapia de enfermedades tumorales, muchos investigadores se interesaron por esta área y un gran número de artículos han sido publicados sobre complejos metálicos del grupo del platino [4-6]. En 1972, Bear y col. reportaron que los carboxilatos de rodio (II) presentaban actividad antitumoral [7-9], sin embargo después de un comienzo promisorio, disminuyó el interés de estos compuestos como agentes antitumorales debido a su considerable toxicidad y poca solubilidad en agua [10,11]. Recientemente han sido publicados varios artículos donde se buscan nuevos complejos de ródio que presenten bajos efectos tóxicos y buena hidrosolubilidad [12-20]. Estos compuestos presentan una estructura dimérica, con dos iones de Rh(II) unidos por puentes de carboxilatos en las posiciones ecuatoriales e en cuyas posiciones axiales L, los átomos donadores como nitrógeno, oxígeno y azufre, pueden formar aductos.

Una buena estrategia para lograr complejos metálicos quimioterápicos sería la síntesis de aductos a partir de moléculas con actividad biológica ligadas a través de las posiciones axiales L [18].

Con el propósito de investigar compuestos con solubilidad apropiada para actividad biológica, han sido sintetizados derivados de rodio (II) con carbohidratos y sus aductos con ciclofosfamida, los cuales mostraron una buena actividad citostática en células K-562 [19].

En este artículo describimos la síntesis y caracterización de dos nuevos derivados de rodio (II) solubles en agua, el gluconato de rodio,  $Rh_2(Gli)_4$ , y el lactobionato de rodio. El lactato de rodio,  $Rh_2(Lac)_4$ , sintetizado en nuestro laboratorio por un método alternativo aquel descrito en la literatura[10], fue utilizado como patrón de comparación de los nuevos derivados de rodio (Fig. 1). Este compuesto fue seleccionado por su alta solubilidad en agua y pocos efectos estéricos, cuando comparado a los derivados de carbohidratos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### A) Materiales y Métodos

Cloruro de rodio (III) trihidratado, de Sigma Chemical Co., D-gluconato de calcio y metanol de Aldrich Chemical Co., lactobianato y lactato de calcio de Fluka Chemie AG, etanol 95% de Merck S.A. Ind. Químicas, y las resinas, Sephadex G-25 fina, G-10 media y C-25 CM de Sigma Chemical Co.

### B) Análisis

El análisis elemental se realizó en un analizador de C, H, N Perkin-Elmer modelo 240B. Los espectros de RMN  $^{13}C$  y RMN  $^1H$  fueron obtenidos en un espectrómetro de RMN Bruker de 300 MHz, utilizándose tubos de resonancia de 5 mm de diámetro y  $D_2O$  como solvente, con capilar de TMS como referencia.

El análisis de IR se realizó utilizando pastillas de KBr, en espectrofotómetro FTIR Perkin-Elmer. Los espectros UV/visible fueron registrados a partir de solución acuosa en un espectrofotómetro Hitachi U-3000. Los análisis térmicos se realizaron por un sistema termobalanza/analizador, Shimadzu TGA-50 y los ensayos biológicos fueron realizados en el Depar-

tamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas, USP, con la colaboración del Prof. Dr. Szulim B. Zyngier.

**C) Síntesis del Tetrakis-Gluconato de dirodio (II),  $\text{Rh}_2[(\text{C}_5\text{O}_5\text{H}_{11})\text{COO}]_4 \text{Rh}_2(\text{Gli})_4$**

Dos mmol de  $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en solución etanólica (50 mL) fueron mezcladas con 2,2 mmoles de gluconato de calcio en solución acuosa (50 mL), seguido de un reflujo en atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 11 horas y a temperatura no mayor de  $75^\circ\text{C}$ , obteniéndose un rendimiento de 22%.

**D) Síntesis del Tetrakis Lactobionato de dirodio (II),  $\text{Rh}_2[\text{C}_{11}\text{O}_{10}\text{H}_{21}]_4 \text{Rh}_2(\text{Lab})_4$**

Um mmol de  $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en solución etanólica (40 mL) fue mezclada con 1,3 mmol de lactobionato de calcio en solución acuosa (60 mL), seguido de un reflujo en atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 6 horas y a temperatura no mayor de  $75^\circ\text{C}$ . Se precipitó el producto (flóculos) con un exceso de etanol, se redisolvió con agua e se realizó una cromatografía en columna de Sephadex C-25 obteniéndose un rendimiento de 5%.

**E) Síntesis del Tetrakis Lactato de dirodio (II),  $\text{Rh}_2[\text{CH}_3(\text{OH})\text{HCCOO}]_4 \text{Rh}_2(\text{Lac})_4$**

Um mmol de  $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en solución etanólica (40 mL) fue mezclada con aproximadamente 1,05 mmol de lactato de calcio en solución metanólica (30 mL), seguido de un reflujo en atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 2 horas y a temperatura no mayor de  $75^\circ\text{C}$ . La mezcla fue filtrada en sulfato de sodio anhidro y el residuo se redujo a aproximadamente 5% del volumen inicial con un calentamiento suave. El compuesto fue purificado por cromatografía en columna de Sephadex C-25, usando agua como fase móvil. Se separaron dos fases, una amarilla y otra azul, esta última de mayor tiempo de retención y correspondiente al producto puro. Se prosiguió con la liofilización del producto. La evaporación en estufa al vacío puede usarse como alternativa en este caso.

**F) Evaluación de la actividad citostática *in vitro***

Las células de leucemia humana K562 fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI con 10% de suero fetal. Para testar la efectividad de los compuestos,  $10^5$  células fueron cultivadas en placas con 24 pozos que contenían 1 mL del mismo medio.

Las muestras fueron adicionadas a los pozos de forma tal que se obtuvieran concentraciones finales de 132  $\mu\text{g/L}$  y 266  $\mu\text{g/L}$ . Una solución de bicarbonato de sodio fue usada como control. Se incubaron por 24 horas a 37 °C en incubadora húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, los contenidos de los pozos fueron colectados, centrifugados y coloreados con azul de Tripán. Finalmente se homogeniza el sistema y se realiza el conteo de células en microscopio. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un test estadístico de  $\chi^2$ . Cuando  $p \leq 0,05$  las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas.

### **G) Evaluación de la toxicidad aguda preliminar *in vivo***

Cuatro grupos de animales, de 10 ratones cada uno fueron utilizados. Dos grupos fueron tratados con dosis de 100 y 200 mg/kg de gluconato de rodio, y otros dos grupos de ratones fueron tratados en las mismas condiciones con lactato de rodio.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **A) ANÁLISIS ELEMENTAL**

Los resultados del análisis elemental de los tres carboxilatos de rodio (tabla 1),  $\text{Rh}_2(\text{Gli})_4$ ,  $\text{Rh}_2(\text{Lab})_4$  e  $\text{Rh}_2(\text{Lac})_4$ , presentaron valores compatibles con el grado de hidratación propuestos, los cuales fueron confirmados por TGA, y son proporcionales al número de grupos hidroxilas disponibles para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua [19]. La pequeña fracción de nitrógeno corresponde a la contaminación por amoníaco utilizado para renovar la resina Sephadex, resaltando la fuerza del enlace axial entre el lactato de rodio e estos residuos. Su remoción no fue posible a pesar de secar en estufa a 150 °C durante 12 horas, sin embargo, para los demás compuestos fue removido por una simple liofilización.

TABLA 1  
Resultados de microanálisis

Compuestos	% Carbono		% Hidrógeno		% Nitrógeno	
	calc.	Exp-	calc.	exptal.	calc.	exptal.
Rh <sub>2</sub> (Gli) <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	27,22	27,41	4,95	4,93	-	-
Rh <sub>2</sub> (Lab) <sub>4</sub> 13 H <sub>2</sub> O	30,83	30,83	5,93	5,53	-	-
Rh <sub>2</sub> (Lac) <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	24,10	23,91	4,04	3,66	-	0,43

### B) ANÁLISIS UV-VISIBLE

Las cuatro bandas características de los carboxilatos de rodio fueron observadas para los 3 compuestos sintetizados, confirmando la estructura propuesta en la Fig.1. La tabla 2 relaciona estas bandas y sus respectivas transiciones [20-24].

RCOO = ligantes ecuatoriales

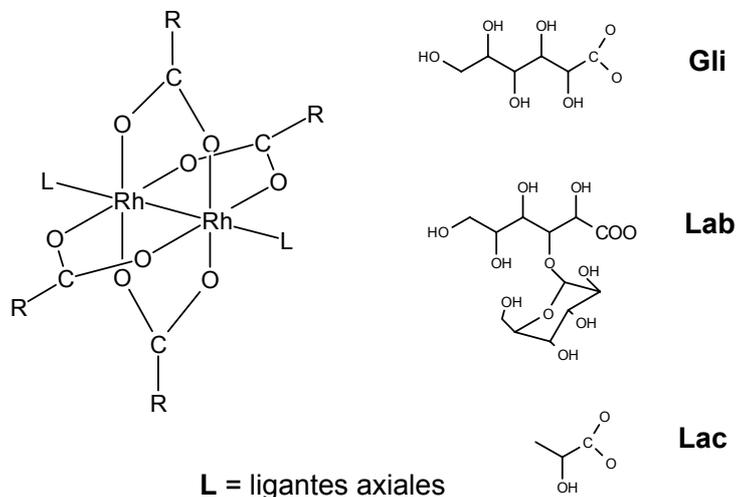


Fig. 1 - Estructura de los carboxilatos de rodio.

TABLA 2

*Análisis por espectrofotometría UV-visible*

BANDA 1 (MAS INTENSA)	~ <b>590 nm</b>	TRANSICIÓN $\pi^*$ Rh-Rh $\rightarrow$ $\sigma^*$ Rh-Rh
BANDA 2	~ <b>460 nm</b>	TRANSICIÓN $\pi^*$ Rh-Rh $\rightarrow$ $\sigma^*$ Rh-O
BANDA 3 (HOMBRO)	~ <b>240 nm</b>	TRANSICIÓN $\sigma$ Rh-Rh $\rightarrow$ $\sigma^*$ Rh-Rh
BANDA 4	~ <b>200 nm</b>	TRANSICIÓN $\sigma$ Rh-O $\rightarrow$ $\sigma^*$ Rh-Rh

**C) ANÁLISIS INFRARROJO**

Algunas bandas importantes observadas en el infrarrojo para nuestros compuestos:  $\text{Rh}_2(\text{Gli})_4$ ,  $\text{Rh}_2(\text{Lab})_4$  e  $\text{Rh}_2(\text{Lac})_4$  aparecen reportadas en la tabla 3. Las diferencias entre las vibraciones de estiramiento asimétrico e simétrico en estos compuestos indican que la interacción rodio-carboxilato es bastante fuerte y según Deacon y col. [25], si las diferencias fueran menores que  $200 \text{ cm}^{-1}$ , los ligantes deben funcionar como bidentados (Tabla 3).

En relación a las bandas de estiramiento OH, se observó un desplazamiento en las frecuencias de mayor energía en comparación con sus análogos iónicos. Estas bandas son fuertemente influenciadas por la carga y el grado de covalencia del enlace M-L, de forma tal que los valores observados fueron más parecidos a los valores de los derivados ácidos de los ligantes utilizados que a los valores de los derivados iónicos de sodio o de calcio ( $\sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ ) [26,27]. Este hecho caracteriza el carácter covalente del enlace Rh-O, mostrando que las interacciones intermoleculares de los grupos OH de estos complejos no se diferencian mucho de aquellas del ácido libre ( $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) [26].

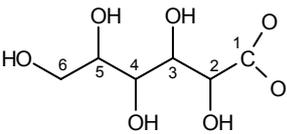
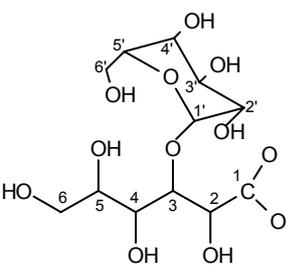
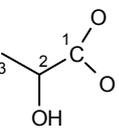
TABLA 3  
*Bandas importantes para carboxilatos hidroxilados de rodio*  
*(cm<sup>-1</sup>)*

<b>Rh<sub>2</sub>(Lac)<sub>4</sub></b>	<b>Rh<sub>2</sub>(Gli)<sub>4</sub></b>	<b>Rh<sub>2</sub>(Lab)<sub>4</sub></b>	<b>ATRIBUCIONES</b>
3420	3397	3397	v O-H
1602	1600	1602	v OCO <sup>-</sup> ass
1421	1418	1415	v OCO <sup>-</sup> sim
<b>181</b>	<b>182</b>	<b>187</b>	<b>Δ (v ass-v sim)</b>

#### D) ESPECTROMETRÍA DE RMN

Fueron observados algunos desdoblamientos en los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los complejos comparados con sus respectivos ligantes libres [16], lo cual es debido a las diferentes conformaciones de los ligantes [26-31]. Los desplazamientos químicos obtenidos para los complejos con ligantes derivados de carbohidratos (Tabla 4) presentan baja resolución debido a la similitud de las vecindades químicas tanto para los protones como para los carbonos, de modo que muchas señales se encuentran sobrepuestas. Una observación importante es que el carbono carboxílico presenta un desplazamiento hacia campo bajo debido al efecto atrayente de los oxígenos enlazados en el, en comparación con sus respectivos análogos iónicos, donde la resonancia de la carga negativa de compuestos iónicos produce un efecto de protección [19, 27-31].

**TABLA 4**  
*Desplazamientos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  RMN observados para carboxilatos hidroxilados de rodio*

<b>Rh<sub>2</sub>(Gli)<sub>4</sub></b>	
RMN $^1\text{H}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	7,24 (OH), 4,00 (H2), 3,87 (H3), 3,63-3,53 (H6,H5), 3,46-3,23 (H4, H6)
RMN $^{13}\text{C}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	191,92 (C1), 72,88 (C2), 72,04 (C3), 70,64-70,47 (C4,C5), 62,27-62,00 (C6)
<b>Rh<sub>2</sub>(Lab)<sub>4</sub></b>	
RMN $^1\text{H}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	4,27 (H1), 4,16(H2), 3,77-3,71(H6, H5, H4, H3, H5'), 3,61-3,25(H2', H3', H4', H5', H6), 2,02-2,01 (d, H6')
RMN $^{13}\text{C}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	191,65 (C1), 103,23(C1'), 80,49(C4), 74,88(C2'), 72,29-71,17(C3,C2), 70,75-70,58(C5', C4'), 68,26 (C5), 61,65 (C6'), 60,59 (C6)
<b>Rh<sub>2</sub>(Lac)<sub>4</sub></b>	
RMN $^1\text{H}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	3,97-3,94 (m, H2), 0,96 (d, H3)
RMN $^{13}\text{C}$ (D <sub>2</sub> O, $\delta$ )	195,35 (C1), 67,19 (C2), 19,79 (C3)

**E) ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD *in vitro***

Los resultados, medias de tres ensayos, son presentados en la Tabla 5. El test estadístico X<sup>2</sup> ha demostrado que tanto para Rh<sub>2</sub>(Gli)<sub>4</sub> quanto para Rh<sub>2</sub>(Lac)<sub>4</sub> la citotoxicidad fue estadísticamente significativa con relación al grupo control. Las bajas actividades de los compuestos derivados de carbohidratos pueden ser debidas a dos factores: baja lipofilicidad (necesaria para atravesar la membrana lipoproteica), y el efecto estérico, sobretudo para el lactobionato que se ve limitado por su gran volumen desde el punto de vista estérico [30-33]. Por otra parte, la buena actividad del lactato confirma los datos descritos previamente en la literatura [14], y al parecer este compuesto reúne adecuadamente los tres parámetros: estéricos, electrónicos y de solubilidad, o sea presenta volumen molecular pequeño, buena hidrosolubilidad y algo de lipofilicidad. Además la fuerza del enlace axial con el amoníaco relacionada anteriormente podría ser correlacionada a su carácter electro-atrayente.

TABLA 5  
*Cuadro de citotoxicidad dos compuestos in vitro*

Compuestos	Células muertas <sup>a</sup> (x10 <sup>4</sup> )		Células vivas <sup>a</sup> (x10 <sup>4</sup> )		Células totales <sup>a</sup> (x10 <sup>4</sup> )		Células muertas (%)	
	dose 132	dose 266	dose 132	dose 266	dose 132	dose 266	dose 132	dose 266
<b>Rh<sub>2</sub>(Lab)<sub>4</sub></b>	1	1	19	15	20	16	5	6
<b>Rh<sub>2</sub>(Gli)<sub>4</sub></b>	1	1	6	5	7	6	14*	17*
<b>Rh<sub>2</sub>(Lac)<sub>4</sub></b>	5	8	5	0	10	8	50*	100*
<b>Control</b>	1		39		40		5	

<sup>a</sup> media de 3 ensayos; p<0,05 en comparación con el control

## F) ENSAYOS PRELIMINARES DE TOXICIDAD *in vivo*

Para los compuestos derivados de carbohidratos no se observó muerte, ni ninguna evidencia de toxicidad aguda en un periodo de 60 días. En el mismo periodo de observación, el lactato produjo la muerte de 5 ratones cuando fue administrado en la mayor concentración y de 3 en la menor concentración. Cabe resaltar que el DL<sub>50</sub> no fue preciso determinarla para el caso de los compuestos derivados de carbohidrato debido a que no se produjeron muertes a pesar de que se utilizaron concentraciones bastante elevadas [19].

Los resultados para el lactato ya fueron descritos en la literatura [14] y en nuestro caso estas experiencias se hicieron para efectos de comparación. Por otro lado, a pesar de la baja actividad antitumoral (presentada en los resultados de citotoxicidad, Tabla 5) de los compuestos derivados de carbohidratos, estos pueden ser usados como transportadores de fármacos, sobretodo de los anticancerígenos de baja solubilidad [18,19].

## AGRADECIMIENTOS

A Maité Iyarreta Veitía, nuestros agradecimientos por la revision del español

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROSENBERG, B. (1985) *Cancer* 55: 2303.
- (2) ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., TROSKO, J.E., MANSOUR, V.H. (1969) *Nature* 222: 385-386.
- (3) ROSENBERG, B, VAN CAMP, L., KRIGAS, T. (1965) *Nature* 205:698-699.
- (4) CRACIUNESCU, D.G., DOADRIO L.A., DOWERAH, D., GOSWAMI, A.C., SINGH, M.M., GHIRVU, C. (1985) *An. R. Acad. Farm.* 51: 653-658.
- (5) CRACIUNESCU, D.G., GHIRVU, C., DOADRIO, A. (1983) *An. R. Acad. Farm.* 49: 515-530.
- (6) CRACIUNESCU, D.G. (1972) *Ion* 32, 367: 78-89.

- (7) BEAR, J.L. (1975) *Cancer Chemother. Rep.* 59 (1): 611.
- (8) BEAR, J.L. (1985) Precious Met. Proc. Met. Inst. conf. 9<sup>th</sup>, New York.
- (9) BEAR, J.L., HOWARD, R.A., KORN, J.E. (1979) *Inorg. Chim. Acta* 32: 123-126.
- (10) NAJJAR, R. (1992) *Quím. Nova* 15 (4): 323-327.
- (11) GIL, E.S., NAJJAR, R.; KUBOTA, L.T. (1998) *Quím. Nova* 21: 755.
- (12) NOTHENBERG, M.S., ZYNGIER, S., GIESBRECHT, A.M., GAMBARDELLA, M.T.P., SANTOS, R.H.A., KIMURA, E., NAJJAR, R. (1994) *J. Braz. Chem. Soc.* 5 (1): 23-29.
- (13) NOTHENBERG, M.S., TAKEDA, G.K.F., NAJJAR, R. (1991) *J. Inorg. Biochem.* 42: 217-229.
- (14) PRUCHNIK, F.P., DANUTA, D. (1996) *J. Inorg. Biochem.* 61: 55-61.
- (15) ESPOSITO, B.P., ZYNGIER, S.B., NAJJAR, R., PAES, R.P., UEDA, S.M.Y., BARROS, J.C. (1999) *Metal Based Drugs* 6 (1): 17-18.
- (16) ESPOSITO, B.P.; ZYNGIER, S.B.; SOUZA, A.P.; NAJJAR, R.. (1998) *Metal Based Drugs* 4 (6): 333-338.
- (17) SOUZA, A.P., NAJJAR, R., GLILKMANAS, S., ZYNGIER, S.B. (1996) *J. Inorg. Biochem.* 64:1-5.
- (18) JOESTEN, M.D., NAJJAR, R., HEBRANK, G. (1982) *Polyhedron* 1, (7-8): 637-639.
- (19) GIL, E.S., GONÇALVES, M.I.A., FERREIRA, E.I., ZYNGIER, S. B., NAJJAR, R. (1999) *Metal Based Drugs* 6: 19-24.
- (20) FARRELL N., HACKER, M. (1989) *Inorg. Chim. Acta* 166: 35-37.
- (21) PRUCHNIK, F.P. (1989) *Pure Appl. Chem.* 61 (5): 795-804.
- (22) DRAGO, R.S., LONG, J.R., COSMANO, R. (1981) *Inorg. Chem.* 20: 2920-2927.
- (23) HOUSECROFT, C. E. (1996) *Coord. Chem. Rev.* 115: 191-230.
- (24) STRANGER, R. (1996) *Inorg. Chem.* 35 (8): 2268.
- (25) DEACON, G.B., HUBER, F., PHILIPS, R.J. (1985) *J. Inorg. Chim. Acta* 104: 41-45.
- (26) TAJMIR-RIAH, H.A. (1983) *Carboh. Res.* 122: 241-248.
- (27) TAJMIR-RIAH, H.A. (1984) *Carboh. Res.* 125: 13-20.
- (28) HORTON, D., WALASZEK, Z., EKIEL, I. (1983) *Carbohydr. Res.* 119: 263-268.
- (29) COFFIN, D.B.; CARPER, W.R. (1988) *Magn. Reson. Chem.* 26: 591-594.
- (30) HORTON, D.; WALASZEK, Z.; EKIEL, I. (1983) *Carbohydr. Res.* 119: 263-268.
- (31) HOWARD, R.A., KIMBALL, A.P., BEAR, J.L. (1979) *Cancer Res.* 39: 2568-2573.

- (32) TSELEPI-KALOULI, E., KATSAROS, N. (1990) *J. Inorg. Biochem.* 40 (2): 95-102.
- (33) WAYSBORT, D., TARIEN, E., EICHHORN, G.L. (1993) *Inorg. Chem.* 32: 4774-4779.



## **Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio**

"EL DR. MOSQUEIRA Y LA INDUSTRIA FARMACEUTICA"  
DR. ALBERTO GIRÁLDEZ DÁVILA  
*Académico Correspondiente de la  
Real Academia de Farmacia*

### INTRODUCCIÓN

Estamos reunidos en solemne sesión para rememorar, a modo de sentido homenaje, la trayectoria profesional del Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio la cual se caracterizó, indudablemente, por una clara plurivalencia: el desempeño de su ejercicio como farmacéutico en el seno del ejército y fuera de él. Y digo plurivalencia porque tanto en una faceta como en la otra fue capaz de llevar a cabo muy diversas actividades.

En la intervención que antecedió a ésta se ha comentado el primer aspecto y ahora toca, por lo tanto, el intentar repasar de forma resumida en un breve espacio de tiempo esa vertiente importante de su perfil profesional, que fue su dedicación a la creación y formulación de los medicamentos en la industria farmacéutica.

Pero aunque el título de esta intervención sólo se refiere a su faceta profesional dentro de la Industria Farmacéutica, he creído oportuno incluir también otras actividades investigadoras del Dr. Mosqueira por juzgar que ambos aspectos son en él inseparables.

## ETAPA DE ASTURIAS

Sin duda, la primera experiencia industrial de D. Arturo Mosqueira fue su destino militar en la Fábrica de Armas de Trubia, como acaba de ser comentado, en el que no se contentó con atender simplemente su servicio de dispensación de medicamentos, sino que monta un laboratorio en el que comienza a realizar investigación acerca de las aleaciones de metales, prueba de ello es que más adelante publica trabajos que recogen sus experiencias, como, por ejemplo, el titulado "Estudio de una colada de acero cromo-níquel en horno eléctrico Demag, básico de 8 Tm" (Anales de la Real Academia de Farmacia, 1947).

Simultáneamente, se matricula en la Facultad de Ciencias Químicas de la cercana Universidad de Oviedo y completa los estudios de tal licenciatura, que finaliza en el año 1943 obteniendo la calificación de Premio Extraordinario. Incansable en el saber y mostrando ya una de las peculiaridades que le caracterizarán a lo largo de toda su carrera profesional, que fue la capacidad de simultanear diversas actividades para lo que tuvo que aprovechar hasta el más mínimo resquicio de tiempo disponible, colabora con la Facultad que le acoge y publica en la Revista de la Universidad de Oviedo, en el mismo año de finalización de sus estudios, un trabajo sobre "Tiosulfato de oro y sodio" (1943).

## ETAPA DE BARCELONA

Ese mismo año de 1943 se traslada a Barcelona para desempeñar, como asimismo ha sido antes referido, la Jefatura del Servicio de Farmacia del Hospital Militar, a la sazón uno de los más grandes e importantes de aquella populosa ciudad; pues bien, desde la farmacia no sólo distribuye los medicamentos necesarios a los Servicios Médicos, sino que aquí monta nuevamente un laboratorio en el que obtiene y da forma farmacéutica a algunos de los principios activos que eran imposibles de conseguir en aquellos tiempos de grandes limitaciones.

Aprovecha además su laboratorio para continuar la tesis doctoral que había comenzado en Oviedo durante sus estudios, pero lo hace con una notable peculiaridad, nadie dirige su tesis, sino que es fruto de sus

propios conocimientos, ideas, experiencias y, sobre todo, de su tesón profesional.

Dos razones le llevan a emprender diversas actividades, además de las susodichas, aprovechando la mayor oferta de posibilidades que le ofrece una ciudad de enraizada tradición empresarial e industrial.

La primera es, desde luego, su inquietud investigadora y su inclinación al ejercicio de la profesión farmacéutica en su vertiente de producción de medicamentos. Pero la segunda, más pragmática, es que los años cuarenta son momentos de generalizado pluriempleo para afrontar las dificultades propias de la época.

De forma que no tarda en orientarse hacia la Industria Farmacéutica de tal modo que es llamado, precisamente, por quien años más adelante sería Académico Correspondiente de esta Real Academia, el recientemente fallecido Dr. D. Isidro Bultó, quien era Director de la Sociedad General de Farmacia, empresa que incluía laboratorios farmacéuticos como el Laboratorio Rocard, de especialidades humanas, y el Laboratorio Neosán, de veterinaria. En efecto, D. Arturo Mosqueira se integra en dicha empresa con la finalidad de dirigir la Sección de desarrollo de productos, formulación galénica e investigación de nuevos preparados.

Así es, por ejemplo, que obtiene una serie de sales de amonio cuaternario con fines de aplicación como antisépticos, del tipo del cloruro de benzalconio, con la consiguiente comercialización de varias de ellas

En esa época publica trabajos de obtención y análisis de medicamentos, como el que versa sobre la "Obtención de efedrina mediante cambiadores de iones" (1948), que aparece en *Galénica Acta* y fue firmado conjuntamente con el Dr. Bultó, y "Determinación de sulfito, tiosulfato y vitamina C" (1951).

En aquellos duros tiempos de reconstrucción y de creación de empresas en los que eran necesarias grandes dosis de creatividad y esfuerzo, en el campo de la farmacia industrial descuella la personalidad, preparación y capacidad de trabajo de D. Arturo Mosqueira, de tal manera que al poco tiempo de su estancia en Barcelona es nombrado Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia en su Sección de

Barcelona, en la que ingresa con un discurso sobre “Esteres de glicerina y ácido fosfórico”, como será comentado en la próxima intervención.

Ese es también el tema que constituye su tesis doctoral la cual una vez finalizada y con el título de "Estudio sobre sales sódicas y cálcicas del ácido glicerofosfórico: su obtención y análisis" es defendida en la Facultad de Farmacia de la entonces Universidad Central de Madrid, ante un tribunal cuyos componentes merecen ser recordados por ser figuras insignes de la farmacia de aquella época: Presidente, Prof. Rafael Folch; Vocales, Profesores Cándido Torres, Ricardo Montequi y Román Casares; actuando como Secretario el entonces joven Profesor León Villanúa. La lectura de la tesis tuvo lugar el día 12 de abril de 1946.

El ya Dr. Mosqueira entra, en 1948, a formar parte del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en el Instituto Celestino Mutis, Sección de Barcelona, en calidad de coordinador, fruto de lo cual es la aparición de varios trabajos en la revista Farmacognosia, firmados algunos en colaboración con el Prof. Ramón San Martín, entre los que se pueden citar: "Dosificación colorimétrica de la atropina. Aplicación de la reacción de Morin" (Vol. X), "Determinación fotocolorimétrica de la morfina" y "Determinación fotocolorimétrica de morfina en preparados galénicos", aparecidos en los Anales de la Real Academia de Farmacia (1948 y 1949).

Posiblemente, desde la perspectiva actual, parecerá inverosímil que una persona que desempeñaba sus funciones en la farmacia de un gran hospital, en la industria farmacéutica, en el CSIC, en la Real Academia de Farmacia, que realiza una tesis doctoral y sin olvidar que también colaboró con una empresa de reactivos para análisis químicos en la obtención y purificación de productos, a pesar de todas esas actividades todavía se viera obligado a dar clases particulares a alumnos que preparaban asignaturas de la carrera de farmacia.

Llegado a este punto, les ruego que me permitan un inciso de carácter personal, porque uno de esos alumnos fue precisamente quien les dirige la palabra, pero me veo obligado a ello por un deber de estricta justicia y de profundo agradecimiento, pues en aquellas clases sostenidas como alumno único, por lo tanto en diálogo continuo, el Dr. Mosqueira me transmitió dos legados de singular importancia para mí.

Desde el primer día me di cuenta que aquél no era un profesor convencional, es decir, no era una persona cuya profesión consistía en enseñar física ya que no explicaba siguiendo un texto, sino que se planteaba los temas como problemas a resolver y una vez planteados iba deduciendo ante mí cuál podía ser la solución, obteniendo así el mismo resultado que aparecía en el libro, pero sin seguir ninguno de sus pasos: por su cuenta. Yo provenía de una buena formación de bachillerato, pero eminentemente memorística - como era usual en la época - y me impactó indeleblemente el método deductivo, que de tal forma me transmitió. En una palabra, me enseñó no a memorizar, sino a discurrir.

Por otra parte, me transmitió algo mucho más pragmático que fue nada menos que la directriz de toda una vida profesional. Me explico. Recuerdo que el último día de clase, al despedirnos me hizo una pregunta insólita para un joven que emprendía el curso preparatorio de una carrera como la de farmacia en cuya profesión no tenía ninguna tradición familiar y apenas conocía de qué se trataba, ni menos qué salidas tenía. La pregunta fue: *Usted, Giráldez ¿qué piensa hacer cuando acabe la carrera?* Quedé atónito y sólo pude contestar con dos palabras: *No sé*. Fue entonces cuando en una sola frase trazó la línea maestra de mi desarrollo profesional. Me dijo: *Haga como yo, ingrese en el Cuerpo de Farmacia Militar lo que le dará una subsistencia y eso le permitirá hacer el doctorado y dedicarse a la investigación*. Y se despidió. A partir de ese momento, supe lo que iba a hacer a lo largo de toda mi vida, pues efectivamente así lo he realizado. ¿Cómo no rendirle en este momento mi más sincero agradecimiento, públicamente?

#### ETAPA DE MADRID

Acabada en el año 1949 la estancia en Barcelona por su traslado a Madrid, el Dr. Mosqueira continúa la trayectoria emprendida pues trae un amplio bagaje investigador y una larga experiencia de industria farmacéutica.

En el primer aspecto, continúa en el Instituto Celestino Mutis del CSIC, hasta el año 1954 en que le resulta incompatible con sus otras actividades y pasa a la situación de coordinador honorario. De esta etapa

quedan trabajos como: "Determinación de Vitamina C en agrios helados" (Anales de Farmacognosia, 1954) y "Determinación de la Vitamina B1" (Anales de la Real Academia de Farmacia).

Por otra parte, la década de los cincuenta es momento del despegue de los laboratorios farmacéuticos con visión de futuro, basado este esfuerzo en la innovación, en el rigor de la producción y su estricto control. Para ello es fundamental la creación de equipos humanos sólidos, formados por personas de alta cualificación científica, de entusiasmo vocacional y de creatividad.

Así es que el Dr. Mosqueira es llamado a formar parte del equipo de los Laboratorios Juste integrándose en el Departamento de Investigación y Desarrollo formado por químicos, médicos y farmacéuticos de renombre en la industria farmacéutica, los cuales por su meritoria labor merecen ser citados. El Departamento de Investigación era dirigido por el Dr. Bernardo Martínez Oller y estaba formado por los Doctores Gayo (Síntesis Química), Luis Aparicio discípulo directo del Profesor Benigno Lorenzo Velázquez (Farmacología y Toxicología), el recientemente galardonado con la Encomienda de la Orden Civil de Sanidad Dr. Alvaro Domínguez Gil (Análisis y Control) y Dr. Arturo Mosqueira (Farmacotécnica y Biblioteca), estando la producción de medicamentos dirigida por el Dr. Francisco Femenía.

Durante las más de dos décadas de actividad de tal equipo, que se va ampliando con el tiempo, se desarrollan, entre otras, una serie líneas de productos: contrastes radio-opacos, antiácidos, hidrolizados de proteínas, antitusivos, etc...; se aborda el entonces difícil tema de los comprimidos retardados y se idean nuevas formulaciones galénicas y métodos analíticos; todo lo cual da lugar a numerosas publicaciones, como: "Obtención del ácido 3-5-diiodo-N-metil-quelidámico", "Obtención de aceites yodados a partir del aceite de nueces", "Nuevos preparados antiácidos", "Separación de aminoácidos por resinas de intercambio y cromatografía en papel", "Separación de aminoácidos por cromatografía bidimensional", "Valoración de hormona tiroidea en cobayos alimentados con crucíferas", etc,...

Simultáneamente a la actividad en la industria, la Fundación Juan March beca al Dr. Mosqueira para que conjuntamente con el Prof.

Mirimanoff de la Facultad de Farmacia de Ginebra, realicen estudios sobre el problema de la separación de alcaloides del cornezuelo del centeno, que dará lugar a varias publicaciones: "Determinación cuantitativa de alcaloides", "Determinación de alcaloides en medio anhidro" (Anales de Farmacognosia); "Influencia de detergentes en la extracción de Alcaloides del Cornezuelo de Centeno" (Anales de Farmacognosia, 1958); "Preparación y fraccionamiento de alcaloides del grupo Ergotoxina-Ergotamina a partir de un cornezuelo de origen español" (Archivos de Farmacología, 1958).

Dando una vez más muestras de su personalidad polifacética, en la década de los cincuenta opta a la cátedra universitaria de Farmacia Galénica, siendo superado por quien años más tarde llegaría a ser Director de esta Real Academia, el Profesor Rafael Cadórniga, con quien mantendrá una firme amistad y asidua colaboración a lo largo de toda su vida profesional, especialmente al coincidir ambos en esta Real Academia.

Como consecuencia de su labor investigadora, se hace habitual la presencia y participación del Dr. Mosqueira en los congresos de Industria Farmacéutica y de Ciencias Farmacéuticas, una prueba de ello es la ponencia presentada en la I Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Española (1961) bajo el título de "La industria farmacéutica en la actual coyuntura económica"; por supuesto, acude a congresos y reuniones tanto en España como fuera de ella, en Alemania, Holanda, Portugal, Suiza, Tailandia,...

Posteriormente, en los primeros años setenta al acercarse el momento del previsible ascenso a General Inspector Farmacéutico, el Dr. Mosqueira duda entre la renuncia al generalato y la permanencia en el Laboratorio en el que desempeña su labor investigadora; en ese momento de indecisión, son sus buenos compañeros del equipo antes citado que le empujan a que culmine su brillante carrera militar, aún a costa de abandonar su vocación industrial.

Efectivamente, se da de baja en los Laboratorios Juste, en los que ha permanecido tantos años, al ser ascendido a general en 1972, como quedó dicho en la anterior intervención.

¿Aquí acaba, pues, su faceta de industria farmacéutica? De ninguna manera; solicita autorización para, en horario fuera de servicio, poder seguir ligado a la actividad industrial, ya que se le presenta la oportunidad de asesorar el Centro de Investigación de nuevos medicamentos, que los Laboratorios Alonga-Lafarquím han creado, a la sazón dirigido por el Doctor en Medicina D. Miguel Izquierdo Sanjosé. La llamada para esta colaboración la recibe del fundador y Director General de tales laboratorios, D. Francisco Llagostera Boté, antiguo conocido y amigo suyo desde los lejanos tiempos de Barcelona en los que éste había cumplido su servicio militar en la Farmacia del Hospital Militar, a las órdenes del entonces comandante Mosqueira.

La labor que desempeña en el Centro de Investigación Lafarquím es fundamentalmente de información sobre campos terapéuticos de futuro y su consecuencia el diseño de nuevos fármacos, dando lugar a una etapa brillante de su creatividad en que desarrolla varias líneas de investigación en el terreno de: productos de acción hipolipemiente, partiendo del clofibrato; antibióticos derivados del ácido 6-amino-penicilánico, obteniendo la Fibracilina (DCI) que fue comercializada con éxito; cefalosposinas de tercera generación; así como antiasmáticos derivados del cromoglicato disódico, del que mejoraban su biodisponibilidad.

Precisamente, el tema del diseño ha sido muy propio del Dr. Mosqueira a lo largo de su trayectoria por lo que constituirá el contenido de sus intervenciones en congresos, por ejemplo, la ponencia que con el título "Aplicación de los sistemas de reconocimiento al diseño de medicamentos" impartió en el II Congreso de Ciencias Farmacéuticas organizado por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (Barcelona, 1972), así como será también el tema de varias de sus aportaciones a esta Real Academia, como se glosará en la próxima intervención de esta sesión.

Por esta especialización en el diseño molecular, el Dr. Mosqueira es requerido, desde el año 1972, por la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Madrid para dictar cursos de doctorado sobre "Química Farmacéutica".

Con el tiempo, el Dr. Mosqueira asume la dirección del Centro de Investigación Lafarquím cargo en el que permanece hasta la desaparición

de éste al ser absorbida, la empresa a la que pertenece, por una firma francesa como un episodio más del actual vértigo de compras y fusiones de laboratorios farmacéuticos.

Consecuentemente, esta situación representa el punto final de la faceta industrial del Dr. Mosqueira; corre el final de los años ochenta

Pero sería un descuido grave al hablar del Dr. Mosqueira como hombre de la industria de producción y desarrollo de medicamentos el dejar de tener presente su actividad en tal sentido dentro del ejército.

Recordemos que en aquella época - años de los cuarenta a los setenta - existían en España seis centros productores de especialidades y material de cura para atender las necesidades sanitarias del ejército, ubicados en Valladolid, Burgos, Córdoba, Calatayud y uno de mayor importancia en Madrid, los cuales abastecían hasta un 70% de lo que era dispensado en los múltiples hospitales militares entonces existentes, además de lo que se distribuía a las farmacias llamadas de plaza, esto es, las que atendían a las guarniciones de toda España, su personal e incluso sus familiares; todo lo cual suponía un enorme conjunto de producción y un extenso petitorio de distintas especialidades, que iban desde comprimidos (antihemorrágicos, antihistamínicos, diuréticos, tuberculostáticos, corticoides, sulfamidas, etc...), inyectables (anestésicos locales, analépticos, sueros, hemostáticos, etc...), pomadas (antiinflamatorios, de antibióticos, desinfectantes, etc...), supositorios (antigripales, balsámicos, etc...), jarabes, gotas, colirios,...hasta material de cura (algodón, gasas, compresas estériles, vendas, esparadrapo, etc,...).

Pues bien, en el principal centro, el de Madrid, es donde desempeñó su actividad profesional el Dr. Mosqueira como investigador dedicado a la innovación, a la síntesis, análisis, producción y formulación de especialidades, llegando a ser al poco tiempo de su incorporación el Jefe de Investigación del Instituto Farmacéutico del Ejército. De este tiempo quedan varios trabajos publicados como el que lleva el título de "Derivados del p-aminobenzaldehído" (Anales de la Real Academia de Farmacia, 1954).

Simultáneamente, en dicho centro, como actividad docente, el Dr. Mosqueira dirigía e impartía los cursos de las especialidades de Análisis y de Síntesis, de medicamentos.

## EPÍLOGO

Para finalizar, necesito destacar algunos componentes de la personalidad profesional de D. Arturo Mosqueira que a mi juicio pueden ser la base de tan extensas actividades. En primer lugar su mentalidad fundamentalmente matemática que aplicaba con ingenio a los problemas físicos, al diseño de medicamentos, a la fisico-química y, por ende, a la farmacotécnica, es decir, aquello que constituía la materia de su pasión investigadora; más de una vez, en reuniones y comités afrontaba los problemas de que se tratara acercándose a la pizarra y cubriéndola de fórmulas, ecuaciones y guarismos que dejaban a una buena porción de la audiencia en difícil situación para seguirle.

Por otra parte, poseía una mente escrutadora, intelectualmente inquieta, abierta a toda novedad, descubriendo siempre en los hechos y situaciones facetas ocultas, claves subliminarias, causas remotas inadvertidas por los demás. De ahí su originalidad en los juicios sobre cualquier problema o evento, sus puntos de vista a veces desconcertantes, sus decisiones sorprendentes.

De él puede decirse que era una persona aguda, no sólo por su finura en los análisis de situaciones y problemas y por sus puntualizaciones siempre precisas, sino en el doble sentido de ser agudo también por lo punzante, con un tinte de ironía que subyacía en muchas de sus opiniones y apreciaciones.

Como datos extraprofesionales, pero que ayudan a definir su personalidad, son su gran sensibilidad artística, tanto en el deleite de la música clásica que constituyó una de sus grandes aficiones, como en la práctica de la pintura; pues, todavía entre sus múltiples ocupaciones encontró tiempo a lo largo de su vida para pintar al óleo cuadro, siempre originales y delicados, que en alguna ocasión merecieron premios en exposiciones o concursos.

Al terminar el repaso somero del perfil investigador e industrial de D. Arturo Mosqueira, siento que he cumplido una mínima parte de mi deuda hacia él, al que tuve siempre, como he dicho y recalco, no sólo un profundo agradecimiento, sino un sentimiento de admiración y respeto;

en correspondencia de él recibí, desde aquella temprana edad de mis diecisiete años, además de sus acertadas orientaciones, un desbordante afecto.



## El General Mosqueira, Farmacéutico Militar

DR. D. LUIS GÓMEZ RODRÍGUEZ  
*Farmacéutico Militar*

## BREVE BIOGRAFÍA FARMACÉUTICO-MILITAR DEL GENERAL MOSQUEIRA

El ejercicio del mando, que deben practicar los que han decidido dedicar su vida a la carrera de las armas, lleva consigo en términos generales, estas tres actividades fundamentales: estratégicas logísticas y tácticas. La estrategia es, en general, el arte de dirigir un asunto. En el aspecto militar, la política señala el fin y la estrategia dice el modo de llevar a cabo las operaciones militares, y se ejerce desde los puestos de gestión; a la táctica corresponde la ejecución, de acuerdo con las normas dictadas por la estrategia y utilizando los medios que proporciona la logística. Estrategia, logística y táctica, son tres ruedas dentadas del engranaje que debe funcionar armónicamente en beneficio de la eficacia. Estos conceptos, que corresponden fundamentalmente a las armas combatientes, son aplicables al Servicio de Farmacia, tanto en pie de paz como en campaña, y prefiguran la carrera del farmacéutico militar que, en su desarrollo deberá ejercer su cometido, sucesivamente, en puestos tácticos o de ejecución al servicio de las unidades combatientes; en órganos logísticos o de gestión; y, finalmente en órganos de dirección y mando. El recuerdo de estos conceptos elementales nos permiten diseñar de forma concreta la biografía del farmacéutico militar que es hoy sujeto del homenaje de esta Real Academia.

A mediados del mes de julio de 1936, Arturo Mosqueira, de veintiún años de edad, había aprobado los ejercicios de oposición para el ingreso en la Sección de Farmacia del Cuerpo de Sanidad Militar. A los opositores aprobados se les concedió unos días de permiso tras los cuales debían realizar unas prácticas para obtener el ingreso en el citado Cuerpos con el empleo de farmacéutico segundo, asimilado al empleo militar de teniente. El joven Arturo salió hacia la sierra para pasar el permiso junto a su madre y allí le sorprendió la guerra. Al presentarse a las autoridades militares de Salamanca, fue asimilado a alférez farmacéutico y comenzó así unas singulares prácticas que había de llevarle a desempeñar, en el

transcurso de la campaña, nada menos que el cometido de jefe del servicio de farmacia de una División. Terminada la guerra, en los cursos de transformación de los oficiales provisionales en efectivos, se situó a la cabeza del escalafón porque tenía la oposición ganada, por los puestos de responsabilidad que había desempeñado en la campaña a plena satisfacción del Mando y por la puntuación obtenida en el propio curso. Ello le permitió iniciar o, más propiamente, continuar una carrera meteórica que le llevó al empleo de general y a permanecer en ese empleo durante ocho largos años. Ascendido a comandante cuando aún era muy joven, se cruzó en la Gran Vía madrileña con un capitán de la Legión que le confundió con un alférez y le llamó la atención por no saludar. Me resisto a dejar de contar una anécdota de aquellos años que dio nombre a los militares de los que ahora se llaman “Cuerpos comunes”. En la primera convocatoria para los cursos de transformación que se llevaron a cabo en Zaragoza, los farmacéuticos se dieron más prisa a preparar la documentación y acudieron en gran número frente al reducido número de médicos, veterinarios, interventores y jurídicos; por ello, bautizaron aquella promoción con el nombre de “aspirinos” y, desde entonces heredaron el mote las siguientes, cualquiera que fuese su titulación, de tal manera que, cuando el pasado año una comisión de la séptima promoción de la Academia General Militar fue recibida por el Rey con motivo de la renovación del juramento a la Bandera, a los cincuenta años de salida de aquella academia, el número uno de la promoción, el teniente general Fernando Pardo de Santayana, me presentó como representante no sólo de los farmacéuticos sino de todos los “aspirinos”, médicos, farmacéuticos, interventores y jurídicos de la promoción. El mote, por supuesto, no tiene carácter peyorativo sino cariñoso y así es aceptado por todo el Ejército. Pero sigamos con la biografía del general Mosqueira: después de los destinos tácticos desempeñados en la guerra, tuvo otros dos, en la farmacia de la fábrica de armas de Trubia, que aprovechó para cursar la carrera de químicas en Oviedo, y en la Farmacia Central de la cuarta Región Militar en Barcelona. Su único destino logístico fue el del Instituto Farmacéutico del Ejército, en los empleos de comandante y teniente coronel; allí fue jefe de las secciones de análisis e investigación y de químicos y galénicos, desempeñando al propio tiempo el cometido de profesor de los cursos de especialización en análisis y en síntesis e

industria químico farmacéutica. Fue también profesor del curso de logística para mandos superiores en la Escuela Superior del Ejército. Ascendido a coronel desempeña su primer destino en puestos de dirección y mando en la Academia de Farmacia Militar donde centraliza los cursos de especialización, estructura y actualiza las enseñanzas del curso de formación profesional de los cadetes de nuevo ingreso y organiza el primer simposio de Farmacia hospitalaria de las Fuerzas Armadas. Promovido al empleo de general inspector farmacéutico, en ese destino estratégico se ocupa de la farmacia de campaña, de la reorganización del Instituto Farmacéutico del Ejército, y de la fabricación y suministro a las unidades militares de productos para medicina preventiva e higiene. Consciente de que, como dijera Cicerón, no basta adquirir la sabiduría sino que es preciso usarla, aprovecho las enseñanzas que había procurado a los alumnos del simposio de farmacia hospitalaria para crear el diploma de especialista en farmacia hospitalaria militar, reconocido por una orden de la Presidencia del Gobierno, con lo que se adelantó varios años al reconocimiento de la especialidad civil. A renglón seguido, aprovechando diversas y favorables circunstancias, como las nuevas orientaciones de farmacia clínica, que llegaban de Estados Unidos, la creación de la especialidad y la reconstrucción del hospital "Gómez Ulla", impulsó patrocinó y prestó ayuda moral y material para la creación de un servicio de farmacia de hospital modélico, nacional e internacionalmente reconocido, gracias también y justo es reconocerlo a la inestimable colaboración del general Hernández Jiménez, director del hospital en aquel tiempo y de los doctores Diz Pintado y Montero que pusieron su ilusión, y su prestigio al servicio de esa idea; la colaboración del farmacéutico con el médico para el uso racional del medicamento en el ambiente hospitalario. Las sucesivas promociones de especialistas llevaron las nuevas técnicas al resto de los hospitales militares. Esta es, muy resumida, la hoja de servicios del general Mosqueira y la historia de su eficacia en las misiones que le fueron encomendadas.

## VIDAS PARALELAS

La biografía es un estilo literario que vino a completar las artes figurativas, la escultura de influencia griega y la pintura típicamente romana. La biografía puede llevarse a cabo de dos formas distintas: una, más fría, superficial y ligera, que se limita a narrar los actos y acontecimientos destacados de la vida del biografiado y otra, más profunda y palpitante, que analiza y expone los rasgos de su psicología, de su carácter. La exposición biográfica que acabáis de escuchar responde al primero de los tipos indicados. Está recogida directamente de la expresión oral del interesado, en el transcurso de medio siglo de convivencia y amistad, no por el mero repaso del lenguaje frío de su hoja de servicios; pero, a pesar de todo, no alcanza la profundidad y garbo de un estudio psicológico. Incapaz de penetrar en su alma y de definir su carácter de forma responsable, me ha venido a la memoria la obra de Plutarco, ya utilizada por mí en alguna otra ocasión, que lleva por título “Vidas Paralelas”. El arconte de Queronea ponía en parangón dos personajes, indicaba los rasgos de su modo de ser que consideraba comunes y mostraba aquello en que coincidían o diferían.

Al hilo de esa idea, mi propósito en esta noche consiste en unas breves reflexiones sobre las coincidencias y discrepancias de nuestros mutuos caracteres. Conocí al comandante Arturo Mosqueira en los primeros días del año 1952. Yo comenzaba, como alumno, el curso de especialización en síntesis química e industria farmacéutica en el Instituto Farmacéutico del Ejército y él era mi profesor. Recuerdo con nostalgia mi primer trabajo del curso: la síntesis del cloruro de vencí-cetil-trimetil amonio, un detergente catiónico, que exigía, como paso previo, la síntesis de la dimetil amina y de la trimetil amina que son las aminas que se producen cuando se descomponen los mariscos; aquel trabajo llevó anejo mi renuncia a comer mariscos durante muchos años y su solo olor, cuando pasaba por una freiduría de calamares, me levantaba el estómago. Después de varios días de trabajo, obtuve las olorosas aminas y las guardé cuidadosamente en el frigorífico para continuar la síntesis al día siguiente; pero, torpe de mí, no dejé indicación alguna y alguien debió de pensar, por el olor, que aquello estaba estropeado y lo tiró. Me gané así la primera

reprimenda por haber perdido casi un mes de trabajo: pero, a los pocos días, cuando las relaciones estaban aún tensas, recibí, inesperadamente, la invitación para celebrar con una merienda en su casa, no sé qué acontecimiento familiar. Allí conocí a su esposa y a sus hijos, Arturito, a quien había visto antes cazando avispa por el patio del Instituto y a Lolina que trataba, sin éxito, de vender papeletas para la rifa de una muñeca a un teniente coronel solterón, en las oficinas de la dirección. En aquellos días se iniciaba una curiosa historia de atracciones y repulsiones. Como si ambos fuéramos conductores de una corriente alterna, si al contacto coincidían los polos se producía la repulsión y, si divergía, la atracción. Teníamos ideas comunes respecto al amor al servicio, al cumplimiento del deber, y al sentido de la responsabilidad. Es decir, coincidíamos en el fondo, pero a veces discrepábamos en la forma, y como la vehemencia era una cualidad común, ambos defendíamos con tesón nuestros puntos de vista. Aunque en aquellas trifulcas nunca llegaba la sangre al río, nos dejaban intranquilos y él tomaba invariablemente la iniciativa y tendía el puente con generosidad; y yo, creo que también con generosidad, lo aceptaba. No en una, sino en varias ocasiones, me llamó a mi casa por teléfono ya de noche para decirme: Gómez, espero que sepa distinguir entre el servicio y la amistad. Ambos podíamos cantar a una voz aquello de “ni contigo ni sin ti tienen mis penas remedio”. Nuestras coincidencias y discrepancias fueron como el cemento que necesita tiempo para fraguar y fraguó y se consolidó en una estrecha amistad y en un afecto sincero. Retirados ambos, nos reuníamos a comer con cierta frecuencia y ya discutíamos más que sobre la cuenta, que los dos queríamos pagar; me decía que le interesaba saber quién invitaba porque, si era yo, aprovecharía para pedir angulas, que le encantaban; el sentido del humor era también común a ambos. Me dio pruebas de afecto que nunca olvidaré; gracias a su intervención, la plaza de teniente coronel farmacéutico del hospital de Carabanchel se convirtió en plaza de coronel y así me evitó salir destinado a Barcelona; un año antes de morir estuvo hospitalizado en la clínica de la Concepción; le visité acompañado de sor Consuelo, la superiora de aquella comunidad, que había coincidido conmigo durante muchos años en el hospital militar “Gómez Ulla”; cuando nos acercábamos a la habitación, sor Consuelo me dijo que estaba muy grave y que la noche anterior creyeron que no vería amanecer; en

aquellas circunstancias, me pidió que le llevara para firmar un papel, para un asunto que no viene al caso, pero que me afectaba favorablemente; me negué porque yo había ido a verle y a preocuparme por su salud y le dije que aquello no era importante en aquel momento; pero el rasgo me conmovió.

Compartíamos también y sobre todo, la inquietud espiritual. Recitábamos al unísono, sin darnos cuenta, los versos del soneto de Valle Inclán: "... en el combate de tantos años ya, mi aliento cede y al orgulloso pensamiento abate la idea de la muerte que le obsede". Y nos consolábamos mutuamente con la frase de san Agustín: "Nos has creado para Ti y nuestro corazón está inquieto hasta que descansa en Ti" (San Agustín, Confesiones).

No, lo de "Vidas paralelas" no es un recurso literario para dar brillo a esta intervención. En uno de sus viajes a Canarias le dejé prestado un libro de Fulton J. Sheen, obispo auxiliar de Nueva York, titulado "Eleva tu corazón", y me lo perdió en el camino. Era un libro que yo apreciaba mucho y que muchas veces he buscado sin éxito. En compensación me regaló el "Poemario Sufi. Poemas de amor divino" de Husayn Manssur Hallâdj, un apóstol islámico que murió decapitado en Bagdad, corte de los Abásidas, en el año 922. En ese libro me puso esta dedicatoria que lleva fecha de junio de 1989:

"A mi amigo Luis, como coincidencia en sentires y amores".

#### UN DIÁLOGO IMPOSIBLE

La última vez que hablé con el general Mosqueira fue el veinte de julio. Le llamé por teléfono para despedirme, porque yo salía de veraneo, y para darle cuenta de unas gestiones que me había encargado en el hospital "Gómez Ulla". Le halle tranquilo y optimista. Me dijo que se encontraba muy bien, que ya salía a comer, y que iría a veranear con sus hijos a Piedralabes. Quince días después, recibí la noticia de su fallecimiento. Aquella noche no me podía dormir; pasaron por mi imaginación como una película, las escenas comunes de nuestras vidas, depuradas ya de cualquier nebulosidad que las pudiera empañar. Vino a mi memoria la canción: ¡Cuando un amigo se va, algo se muere en el alma!; recordé nuestros diálogos y me rebelé ante la idea de no poder

hablar con él nunca más. Soñé despierto con un diálogo imposible; él estaría allá, más arriba de las estrellas que titilaban en el cielo de la bahía palmesana, y me preguntaría por nuestras cosas de aquí, y yo, con mucha más curiosidad, de las cosas de allí. Primero le daría novedades: usando el lenguaje del personaje benaventino de “Los intereses creados”, le contaría que aquí seguíamos, como siempre, como muñecos de guiñol movidos por los hilos de nuestros intereses, pasioncillas y miserias; pero que, de cuando en cuando, nos llegaba del cielo un rayo de luz que nos decía que “no todo es farsa en la farsa, que hay algo que es verdad y que es eterno, que no puede acabar cuando la farsa acaba”. Pero ¿Cómo preguntarle a él por su nueva vida, por su experiencia en el otro mundo? Acababa de leer un libro en cuyas páginas un discípulo interrogaba a su maestro muerto y me apropié de sus versos, y añadí otros para decirle:

“Dime, maestro, ahora/ que ya conoces todo lo que pasa: / ¿qué es esto que tenemos en las manos, / dolores o esperanzas? / ¿Desde dónde nos miras/ y en dónde nos aguardas? / ¿Y es que la vida es sólo /este valle de lágrimas, / o es un tirón la muerte que nos sube / a las altas montañas / donde la luz que desde aquí soñamos / nace y nunca se apaga?... Mira maestro: / Aquí todos lo hicimos / como siempre que llega la muerte, / nuestra hermana: / Te pusimos en tierra; / nuestros ojos lloraban; / en la tarde de agosto / hubo flores y abrazos y responsos y lágrimas; / el sol se iba muriendo / sobre el regazo azul del Guadarrama, / y yo, de pronto, me encontré, maestro, / huérfano de enseñanzas / ..... Espérame, maestro; no me borres / de tu lista de cátedra; / cuando digas mi nombre /discúlpame la falta. / Llegaré cualquier día / y tú me dirás: pasa / ....Dime, maestro, ahora / que ya conoces todo lo que pasa / ...¿Será verdad aquello que “soñábamos”? / Explícame, maestro, ¿qué destino / le guarda Dios a España? / ¿Qué es esto que tenemos en las manos: /¿Dolores o esperanzas?” (El callejón del gato. Retratos al vitriolo de Jaime Capmany).

Fue un diálogo imposible / Nadie me contestaba / Me abrumaba el silencio / solamente las olas, / rumorosas, rezaban / pregunté a las estrellas / y no obtuve respuesta / las estrellas callaban / El viento estaba en calma / y mi alma dolorida / anegaba en la pena / en la noche serena / de la bahía de Palma.

## LA MUERTE NO ES EL FINAL

En la Academia General Militar de Zaragoza tiene lugar cada año una ceremonia singular, de tal emoción que en muchos momentos se hace un nudo en la garganta, se nubla la vista, y un escalofrío recorre todo el cuerpo; el acto consta de dos partes: la jura de Bandera y el homenaje a los muertos; dos ritos de la vida militar, de su orto y su ocaso, de su alfa y omega. Os invito a que me acompañéis con la imaginación de una de esas ceremonias simbólicas, esta vez en honor del general Mosqueira. La jura de Bandera es como un rito de iniciación mediante el cual se accede a soldado del Ejército español. Al besar con unción la Bandera que bordara una reina, se ofrece la propia vida y se promete bajo juramento, entre otros extremos, respetar y obedecer siempre a nuestros jefes y no abandonarlos nunca. Esa es, por encima de cualquier otra consideración, incluso por encima de la amistad, la razón de que no esté hoy aquí. A esos mocetones que permanecen firmes en la formación y que cantan el himno de la Academia, “Siempre que ondea al viento la Bandera, rojo y oro bajo el sol, mi corazón siento latir, con orgullo de español”, a esos mocetones – digo – no les espera una vida fácil, estarán sometidos a un rígido código de conducta, a una severa disciplina, no digo mal pagados porque lo prohíben las ordenanzas, temiendo más que deseando el ascenso que, a veces, lleva consigo un traslado familiar sin que la nómina apenas lo note, de servicio permanente las veinticuatro horas del día de todos los días de su vida profesional, incomprendidos unas veces, ignorados otras, amenazados y en ocasiones denostados. Están allí “siempre voluntarios para ocupar los destinos de mayor riesgo y fatiga” (Decálogo del cadete); para sustituir, si es preciso a las bajas en combate o para caer ellos mismos. Acaso alguna de sus “Conchitas Martín” tendrán algún día que decir: “estamos atribulados pero no angustiados; nos abaten, pero no perecemos; nos derriban, pero no nos aniquilan...” (San Pablo, Corintios II). Impresionante nuestra resignación y entereza de la familia militar. ¡WY luego dicen que el pescado es caro”!. (Título de un cuadro de Sorolla que representa las penalidades de la vida en el mar). En esas filas estuvo el general Mosqueira para besar la Bandera y prestar juramento; en esas filas tuve yo el honor de formar; allí estuvieron también nuestro hijos, su hijo Arturo, hoy coronel de infantería diplomado en Estado

Mayor; mi hijo Luis, hoy comandante de artillería, diplomado en Estado Mayor. ¿Se comprende mejor ahora de “Vidas paralelas”?

La segunda parte de la ceremonia es el rito de difunto; se honra a los compañeros perdidos. Los ejércitos tienen una gran sensibilidad y un recuerdo emocionado por los que nos dejaron, pero muy especial por lo que entregaron su vida por la Patria de forma heroica. Permitidme una expansión sentimental que formulo como sentimiento químicamente puro, sin trazas de reproche, protesta o resentimiento. En mi ya larga vida, he recorrido las aulas y laboratorios de nuestras facultades, los despachos de los colegios profesionales y las salas de las Academias; he visto con satisfacción y orgullo placas, retratos y dedicatorias de beneméritos maestros, de colegas insignes, que entregaron su vida, de una forma o de otra, a nuestra querida profesión; hubiese querido encontrar, fuera del ámbito militar, alguna referencia, algún recuerdo dedicado a quienes ejerciendo como farmacéuticos, o como auxiliares de los farmacéuticos, los sufridos practicantes de Farmacia, entregaron su vida en campaña, o como consecuencia de sus penalidades, o víctimas del terrorismo.

El que he llamado “rito de difuntos”, se compone del toque de oración y del canto de un himno de Fe y confianza. Durante el toque de oración, los guiones de las unidades que componen la formación, se inclinan en homenaje a los que “No quisieron servir otra bandera, no pidieron andar otro camino, no supieron morir de otra manera” (oración de homenaje a los caídos); se coloca una corona de laurel al pie de la Cruz y el tañido de la campana que cuelga de una espadaña, sobre el tejado de la plaza de armas llama a la oración. El recuerdo de esta ceremonia nos da ocasión para pedir hoy por el general Mosqueira: A ello os invito.

Para terminar el acto, los cadetes cantarán “La muerte no es el final”, cuya letra dice así:

“Tu nos dijiste que la muerte / no es el final del camino “ que,  
aunque morimos / no somos carne de un ciego destino / Tú nos hiciste,  
tuyos somos; nuestro destino es vivir / siendo felices contigo sin padecer  
ni morir / Cuando la pena nos alcanza / por un compañero perdido /  
cuando el adios dolorido / busca en la Fe su Esperanza / en Tu palabra  
confiamos / con la certeza que Tú / ya le has devuelto a la Vida / ya le has  
llevado a la Luz/.

¡Descanse en paz el general Mosqueira, mi general y mi maestro,  
nuestro compañero y nuestro amigo.

## **In Memoriam del Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio**

EXCMO.SR.D.VICENTE VILAS SÁNCHEZ.

*Académico Numerario.*

La andadura académica del Dr. D. Arturo Mosqueira comenzó en 1944, firmando la solicitud de ingreso como Académico Correspondiente en la Sección de Barcelona. Para lo cual acompañó un trabajo inédito bajo el título "Esteres de la glicerina y del ácido fosfórico", que fue refrendado y aceptado por el Presidente de la Sección de Química Orgánica, a la sazón el Prof. Dr. D. Ángel Santos Ruiz, el día 21 de octubre de 1944.

La confirmación de ingreso fue avalada por los Excmos. Sres. D. Rafael Roldán, D. Ramón San Martín Casamada y D. Mariano Losa España, efectuándose la solemne sesión de investidura el 11 de enero de 1945, en la que leyó el trabajo arriba mencionado, y del que entresacamos algunas líneas que nos permitirán proyectar en el futuro su imagen y vocación hacia la Farmacia:

Muchos de los que me escucháis comprenderéis fácilmente este sentimiento, si vuestra vida se desarrolló, como la mía, en un ambiente de culto a la Farmacia, en la cual la Real Academia representa una de esas metas hacia las que nos sentimos, cuando en el alma anidan fe y ambiciones, obligados a alcanzar.

Quisiera que esta Corporación me recibiera, si no es pretender demasiado, como a un componente de esta joven generación de farmacéuticos que, con ilusión y tenacidad inquebrantable para todo cuanto signifique Farmacia, lucha y vence por conseguir que nuestra profesión ocupe el rango que otros maestros y compañeros, mejores que nosotros, nos enseñaron debía ocupar.

Pero quisiera, sin embargo, llevar a vuestro ánimo la seguridad de que todo cuanto un corazón joven es capaz de soñar - creó, como Quelel, que quien sueña es el corazón- trataré de

realizarlo en pro de nuestra profesión, poniendo a contribución todo mi entusiasmo y lo mejor de mí mismo.

Expresión que fue el lema y estandarte de toda su vida profesional, con un profundo amor y dedicación a la Farmacia, tanto en el aspecto científico e industrial, como en el académico y docente.

En la década de los cincuenta la Sección de la Academia en Barcelona se constituyó como Real Academia de Farmacia de Barcelona (hoy de Catalunya desde 1992), por lo que el Dr. Mosqueira se convierte en Académico de número, Medalla número siete, con antigüedad del 2 de diciembre de 1956. Tomando posesión de tal Medalla el día 21 de abril de 1956. Pasando a la excedencia el 4 de marzo del año siguiente, por cambiar de residencia a Madrid. De la etapa como académico de Barcelona quedan ocho trabajos publicados en los anales de la Real Academia de Farmacia, los que ya han sido comentados anteriormente.

Un posterior ascenso en su carrera militar le trajo a Madrid, al Parque Central de Farmacia Militar. Vinculándose inmediatamente con esta Real Academia de Farmacia. Asistiendo a los actos públicos y participando en publicaciones que ya han sido mencionadas por los Excmos. Sres. que me han precedido en el uso de la palabra.

Al producirse el fallecimiento del Excmo. Sr. D. Marciano Valdelomar Gijón, se produjo la vacante de la Medalla número veinte que ostentaba dicho Sr. Académico. El 30 de abril de 1973 fue anunciada en el Boletín Oficial del Estado la vacante de dicha Medalla. El 3 de mayo de ese mismo año, y presentado por los Excmos. Sres. D. Ángel Santos Ruiz, D. Nicolás Gutiérrez del Álamo y D. Luis Benito Campomar, proponen al Dr. D. Arturo Mosqueira para dicha Medalla, y ese mismo día firma el compromiso de aceptar el cargo en caso de ser designado.

El 7 de junio de 1973 se celebra la Junta General para elegir nuevo académico en la vacante de la Medalla número veinte. Acto seguido se procede a la votación entre los veintiún académicos presentes, más seis que emitieron su voto por correo. El resultado fue de veintisiete votos para el candidato, por lo que el Sr. Presidente lo proclama electo por unanimidad. De esta forma quedó vinculado a esta Real Academia de Farmacia como Electo, hasta que el día 7 de noviembre, en solemne sesión pública, y

acompañado de los Excmos.Sres. Académicos, Dres. Hoyos y Rodríguez, entró en este salón para leer su discurso, que versó sobre "La teoría de los orbitales moleculares y el diseño de nuevos medicamentos". Que a su término fue contestado reglamentariamente por el Excmo.Sr.D.Antonio Doadrio, quedando investido académico numerario de esta Real Academia, en la Medalla número veinte. Del discurso de contestación del Prof.Dr.Antonio Doadrio me permito entresacar un párrafo que retrata la personalidad del Dr.Mosqueira:

"Es un hombre ejemplar en su capacidad de trabajo, en su actividad incansable, que aunque aparentemente dispersa en varios campos la ha sabido siempre unificar en un contexto científico, y sobre todo, es la de un hombre que ha sabido mantener una fe investigadora aunque las circunstancias, en muchos momentos, no le eran favorables para ello y que podría ser un claro ejemplo para aquellos que se desilusionan con tanta facilidad al primer atisbo de dificultades. Si a ello se une su carisma especial de afabilidad, sencillez y humanidad bien podemos sentirnos satisfechos con la adquisición que hace hoy la Real Academia de Farmacia".

Las circunstancias medioambientales en que tuvo que desarrollar su formación y su investigación el Dr. Mosqueira estaban encardinadas en el contexto de grandes dificultades que padecía todo el país, pero como dijo Aristóteles "En las adversidades sale a la luz la virtud", y esta virtud, manifestada en un gran tesón, por continuar su meta de formación y de investigación, le hizo merecedor del ingreso en esta Real Academia.

Su colaboración y participación en la vida de esta Institución fue muy intensa, y ello lo avala los datos estadísticos de que asistió en su vida académica a más de seiscientas sesiones públicas, y alrededor de ciento cincuenta Juntas Ordinarias y Extraordinarias.

Fue jurado en diversos premios durante todos los años de su vida académica, y miembro de la Junta de Gobierno por ser Presidente de la Sección Tercera de Farmacología y Farmacotécnica, así como Vocal de la Comisión de Admisiones y de Publicaciones. Presentó a diversos Académicos Correspondientes, entre ellos a los Dres. D. Alberto Giráldez y D. Luis Gómez Rodríguez.

En la inauguración del curso 1976, el Dr. Mosqueira, leyó el discurso protocolario con el palpitante tema "El problema de la creación de nuevos medicamentos", en el que aborda magistralmente la problemática del mundo del medicamento que extiende entre límites amplios desde la obtención de una molécula biológicamente activa, la comprobación de su eficacia farmacológica y los problemas tecnológicos de producción, así como el estudio de su biodisponibilidad, la previsión y determinación de efectos secundarios, los ensayos de farmacología clínica, la elección de la forma idónea de administración y finalmente los problemas de orden financiero, económico y de marketing que influyen de forma sustantiva en el conjunto del medicamento como problema.

Como se analiza ello comprende unas técnicas de orden extraordinariamente variadas y la participación de personas de muy diversas calificaciones técnicas, que tienen que participar en el ciclo de creación del medicamento. A esta complejidad se unen las cautelas, cada vez mayores, que los organismos oficiales de los Estados oponen a la distribución en el mercado de medicamentos no debidamente comprobados, lo que produce y seguirá produciendo, una disminución en el número de nuevas moléculas utilizables en la terapéutica. Comenta que el Centro de Información de Haen, según los datos que facilitó entre 1968 y 1972 sólo fueron incorporadas al panel terapéutico 61 nuevas moléculas.

De otro lado, en 1970 (Pharmascope, enero 1973) indica que fueron ensayados 126.080 nuevos productos, y sólo pasaron el exhaustivo screening para incorporarse al mercado 16 nuevas entidades.

A lo largo del discurso se hacen análisis de diversas vías de investigación en el descubrimiento de nuevas familias de moléculas activas y se analizan los esfuerzos de síntesis y modificación de moléculas ya consagradas, para descubrir incrementos de actividad o reducción de niveles de toxicidad. Atisbándose las aplicaciones de los métodos de análisis estructural de la mecánica cuántica, permiten vislumbrar a nivel teórico estructuras que puedan tener una cierta aplicabilidad farmacológica. Haciendo especial mención a una publicación fundamental en esta orientación, como es el libro *Strategy of Drug Design* ("Interscience", 1973, págs. 43-45) del que son responsables Purcell, Bass y Clayton. Utilizando los índices de la mecánicas cuántica de los modelos L.F.E.R., que intentan

predecir la actividad de un compuesto no ensayado a partir de datos recogidos de una serie pequeñas de moléculas relacionadas estructuralmente. Es decir, localizada una molécula "leader" analizar las propiedades físico-químicas, como los parámetros hidrofóbicos, electrónicos, estéricos e índices, tales como las densidades de carga y superdeslocalización nucleófila o electrófila, densidad del electrón frontera, valores de E lomo y E homo, etc., todos procedentes de datos obtenidos de las propiedades cuánticas. A partir de esos parámetros se intenta llegar a conocer el mecanismo de acción y predecir la actividad de una nueva molécula teórica relacionada estructuralmente con la serie estudiada. En esta época se planteó una frontera, de momento inaccesible, por la laboriosidad de cálculo que se exigía, cosa hoy mejor superada con los potentes y rápidos ordenadores.

Termina considerando que este complejo campo del diseño de medicamentos, comprende problemas legales de patentes, marketing, inversiones financieras muy sustanciosas, investigación fundamental del nuevo sistema de diseño de moléculas activas, estudio de los parámetros físico-químicos y elevados conocimientos de las fuerzas biológicas a nivel molecular, correspondiendo a nosotros, expertos del medicamento, desarrollar y orientar para el mejor cuidado del enfermo, último fin y objetivo de nuestra profesión.

Nuestra Junta de Gobierno, le nombró el 21 de Febrero de 1977, Delegado en la Comisión Asesora Científica de la Prestación Farmacéutica sobre Medicamentos para Instituciones Sanitarias; mas adelante esta Junta acordó nombrarle el 22 de febrero de 1977, miembro de la Comisión de la Medalla Carracido. En este mismo año, el 8 de noviembre, fue nombrado Vicesecretario Interino. Confirmándole el 13 de diciembre, en este cargo. El 15 de diciembre de 1983, vuelve a ser confirmado en el mismo cargo, y posteriormente en Junta del 18 de Diciembre de 1986, se le reelige. Siendo durante todo este dilatado tiempo Vicesecretario del Secretario Perpetuo, a la sazón el Excmo.Sr. Dr. D.Manuel Ortega Mata.

Posteriormente, el 6 de Julio, se le designa como representante de esta Real Academia en la Comisión Asesora Científica de la Subdirección General de Asistencia Sanitaria y Prestaciones Farmacéuticas del Instituto

Nacional de la Salud, como respuesta a la solicitud cursada por el Ministerio de Sanidad y Consumo.

Ha participado en Cursos de Doctorado pertenecientes al Instituto de España desde el año 1991. En 1990 fue nombrado coordinador de la Comisión encargada de redactar el informe solicitado por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. El 13 de Octubre de 1994, esta Junta acordó nombrarle como experto en nomenclatura química, representante de esta Corporación en la redacción de la Farmacopea Española y revisión de la Farmacopea Europea, atendiendo a la solicitud de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios.

Se responsabilizó de la coordinación de los trabajos que condujeron a la edición del primer número de la serie denominada "Monografías de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España de Actualización en Ciencias Farmacéuticas", que llevó por título *Diseño de Medicamentos*. D. Arturo, además de la coordinación, participó en este primer volumen con dos trabajos, uno sobre "Distancia Geométrica" y otro referido a los "Fundamentos del *Diseño de Medicamentos*", *ambos de gran actualidad científica*.

Como se pone en evidencia, ha participado en numerosas acciones y actividades en nuestra Academia, pero especialmente, como dijo San Francisco de Sales "Dios no juzga de la perfección de nuestras acciones, ni por el número de ellas, sino por el modo", y esto si que es aplicable en nuestro caso, pues en todas sus participaciones manifestó un talante conciliador y dialogante, y siempre manejando los valores positivos en las relaciones humanas. Vienen a mi memoria las palabras de Mlle.Scudery que manifiesta que "Las acciones son mucho más sinceras que las palabras". Por lo que su ausencia la notaremos profundamente, al no contar ya con su consejo y anuencia en muchas circunstancias.

Personalmente tuve la satisfacción de que esta Academia le encomendara el discurso de contestación reglamentario a mi ingreso el 18 de abril de 1991, y en el cual aparte de las consideraciones técnicas, me hizo un fiel bosquejo de mi persona, y que según comentarios de los que le oyeron y leyeron, constituía un análisis detallado de mi psiquis, que solo podía hacerlo una persona con profundo espíritu observador, llena de afecto y paternal amabilidad.

Concretamente le debe una deuda de gratitud inconmensurable por las numerosas y constantes enseñanzas y orientaciones que son tan necesarias en los difíciles e indecisos momentos de la iniciación profesional. Recuerdo que me aconsejó cómo debería de tratar y relacionarme con las personas que en mi entorno participaran en una tarea común, y para que aunaran los esfuerzos y colaboraran decididamente y con entusiasmo al proyecto. Creo que me recordó la frase de La Cordaire "Para gobernar se necesita sin duda la firmeza, pero también mucha flexibilidad, mucha paciencia, y mucha comprensión".

La Junta de Gobierno del 27 de Febrero de 1997 y a propuesta de la Sección 3ª Farmacología y Farmacotécnica acordó designarle para pronunciar el discurso de la sesión inaugural, y que fue leído en la solemne sesión del 22 de enero de 1998, versando sobre "Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos". En el que exalta la contribución de la mecánica cuántica a la dilucidación de la configuración de moléculas e interacciones con el receptor, al considerar las coordenadas de posición, de energía y eventualmente de tiempo, que se sintetizan en el Hamiltoniano de la mecánica clásica. No obstante, no es posible utilizar los principios de esta mecánica que no son aplicables a la estructura subatómica, de aquí, que hay que hacer una correlación con la mecánica cuántica. Después de presentar las bases de la misma en un análisis muy didáctico, en el que basa el método de Hartree-Fock y considerar las diferentes variables que plantea, no tanto las repulsiones interelectrónicas, sino la presencia de varios núcleos, para posteriormente presentar los métodos aproximados de cálculo con los diversos métodos de I.N.D.O, MINDO, N.D.D.O y M.N.D.O. y otras consideraciones que analizan la utilización de los métodos semiempíricos en el cálculo de energías conformacionales. Todo ello, en el afán de predecir la mayor estabilidad y realismo de la estructura molecular.

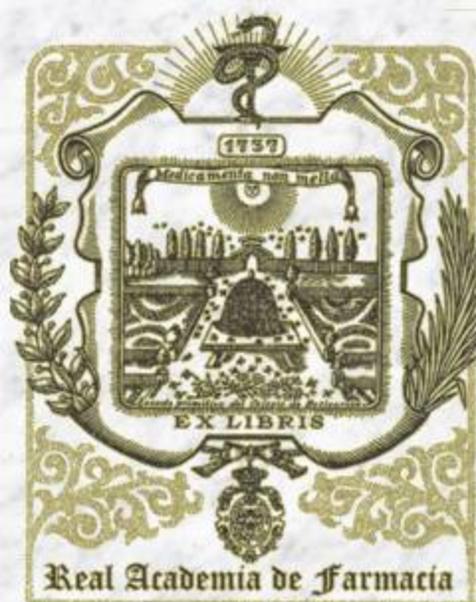
El 26 de febrero de 1998, la Junta acordó nombrarle Presidente de la Sección 3ª de Farmacología y Farmacotécnica, vacante por el fallecimiento del Excmo.Sr. Dr. D. Eugenio Selles Martí.

Permaneció durante mucho tiempo en plenitud de actividad, salvo en momentos muy puntuales, en los que se manifestó su ya quebrantada salud, hasta que el pasado 6 de agosto, de forma silenciosa y recogida, se adelantó

a todos nosotros, en el camino hacia el Padre. Y como decía Marco Aurelio "Morir no es otra cosa que cambiar de residencia". Y como en todos nosotros, que lo queríamos y apreciábamos, podríamos decir que "Vivir en el corazón y memoria de los que dejamos detrás de nosotros no es morir".

Que en paz descanse.





MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA

[www.ranf.com](http://www.ranf.com)