

INSTITUTO DE ESPAÑA

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



**2000**

**VOLUMEN LXVI**

**Núm. 3**

**Publicación trimestral**

**Domicilio de la Academia**

**FARMACIA, 11**

**28004 MADRID**



Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

---

## **La Ciguatera: Intoxicación por biotoxinas marinas**

DRA. ROSA RICOURT REGÚS  
*Académica Correspondiente*

### RESUMEN

Existiendo en los océanos y mares, preferentemente en zonas tropicales y subtropicales, donde abundan los protozoos del género Dinoflagelado, los peces y mariscos que comen éstos, o en cadena como otros que ya han ingerido estas biotoxinas que poseen los microorganismos mencionados, al ser ingeridos por el hombre éste contrae la intoxicación llamada Ciguatera, la que presenta una sintomatología muy especial, y sólo desaparecen las secuelas con el tratamiento por Manitol.

**Palabras clave:** Ciguatera.- Biotoxinas marinas.- Toxicología.- Tratamiento

### SUMMARY

#### **The ciguatera: Intoxication by Sea biotoxines**

There are protozoos in oceans and seas, mainly in tropical and subtropical zones, that are eating by fishes and seafoods or by others. Then when the man eat those aliments are intoxicated and the illness is called "Cigüatera". This illness have a special sintomatology and the symptoms only desapeared with a treatment with Manitol.

**Key words:** Ciguatera.- Sea biotoxines.- Toxicology.- Treatment.

La **Ciguatera** es una intoxicación ocasionada por ingerir pescado ciguatado. El pez se ciguata al ingerir biotoxinas marinas. En el hombre es una intoxicación aguda como resultado de haber comido ciertos peces tropicales o subtropicales que habitan en zonas de arrecifes coralinas próximos a las costas y que han adquirido esas biotoxinas.

Se considera que más de 400 (cuatrocientas) especies de peces, incluyendo los de alto valor alimenticio han sido asociados, mejor dicho relacionados con estas toxinas marinas.

Las especies de mayor riesgo son los herbívoros, y los carnívoros que se encuentran en las zonas comprendidas entre la altitud 35° Norte, y la latitud de 25° Sur (Hessel et al., 1960).

Los peces herbívoros que se encuentran en las mayores profundidades adquieren los Dinoflagelados que se encuentran en las microalgas y otros sustratos marinos.

Se acepta, en general, que los casos reportados de esta epidemia (la ciguatera) ha aumentado por la gran demanda de alimentos marinos y el aumento del comercio de explotación de peces y mariscos. Se considera que la concentración de microorganismos ha ido en aumento en los mares y océanos, con lo cual han aumentado las áreas infectadas por biotoxinas o ictiotoxinas o ciguatoxinas.

La Ciguatera ha sido relacionada con las fuertes lluvias, tormentas, sismos, construcciones de puentes, de muelles, bombardeos en zonas marinas, que alteran los arrecifes coralinos; y por las agresiones provocadas por el hombre.

## I.- HISTORIA

Haciendo un poco de historia nos encontramos con referencias sobre el pescado tóxico; por ejemplo se hace mención en la Odisea de Homero (800 A.C.).

En el año 600 antes de Jesucristo fue descrita esta epidemia de ciguatoxina en la China; y en la época de Alejandro el Grande (356-323 A.C.) se les prohibió a los soldados ingerir pescado para evitar indisposiciones y enfermedades durante las conquistas.

En el 1555 fue reportada por Peter Martyr en las Indias Occidentales. En el 1774 fue reportada esta epidemia por el Capitán de Navío James Cook en el Sur del Pacífico (Ref. Cook 1777).

El nombre de Ciguatera proviene del siglo XVIII, y fue utilizado en Cuba para describir la enfermedad relacionada con la ingestión de la

carne de una especie de caracol, el Tubro-pica, cuyo nombre común es Cigua.

El nombre de Dinoflagelados viene del griego *dimos* que significa giratorio.

Muchas especies de los Dinoflagelados son formaciones planctónicas marinas. Uno de los grupos más raros de protistas es el de los Dinoflagelados. La mayor parte de ellos son unicelulares, aunque existen pero muy pocas las formas coloniales. Sus células, a menudo, están cubiertas por placas de celulosa impregnadas de silicatos.

Dentro de la Clase Mastigoforos Flagelados, cuyo nombre vienen del griego *Mastix* que significa látigo y *phoros* que significa llevar están los Fitomastiginos, dentro de los cuales están el género *Euglena* los que son de vida libre, son coloreados como cromatóforos y su nutrición es holofítica.

Las especies del Orden Dinoflagelados son principalmente de origen marino y suelen tener una especie de armadura celulósica y formada por dos placas: *Ceratium* y *Peridium*. Junto a las diatomeas son parte importante del planctón microscópico o “prados del océano” y constituyen el alimento de pequeñas larvas, crustáceos y otros animales marinos.

Cada dinoflagelado tiene 2 flagelos: uno arrollado en surco transversal que está situado en el centro de la célula como un cinturón, el otro flagelo está colocado en un surco longitudinal, perpendicular al otro, y se proyecta más allá de la célula. La ondulación de estos flagelos impulsa al dinoflagelado en el agua con un movimiento de trompo giratorio.

La mayor parte de los Dinoflagelados realiza la fotosíntesis y poseen pigmentos de clorofila a, clorofila c y carotenoides.

Algunos son incoloros y se alimentan ingiriendo otros organismos. Sus productos de almacenamiento son aceites y polisacáridos. Muchos son endosimbióticos, que residen en invertebrados marinos como medusas, corales y moluscos.

Esta variante carece de placas de celulosa y de flagelos y se denominan Zooxanteles; éstos proporcionan alimento a su socio invertebrado.

La contribución de éstos a la productividad de los arrecifes coralinos es sustancial. Existen, otros: los heterótrofos que son parásitos de sus huéspedes.

Su reproducción es sobre todo asexual; pocos géneros se reproducen sexualmente, estas características se refieren a los dinoflagelados en general.

En las costas norteamericanas son muy abundantes (de 20 a 40 millones por litro).

El *Gymnodinium brevis* en el 1947 ocasionó la muerte a miles de millones de peces y tortugas marinas en la costa occidental de La Florida, por las toxinas que produjeron, causando lo que se llama el agua roja del mar durante el día y luminiscencia en la noche.

El *Gonyaulax calenella*, en la costa de California es un alimento cotidiano de los bivalvos, entre esos los mejillones (*Mytilus*) siendo inocuo para los bivalvos pero tóxico para el hombre, durante el verano que es época en que el molusco se alimenta en gran parte de este protozoo.

Ha habido casos de hasta 400 casos de enfermedad y 36 casos de defunciones, algunos protozoos tienen color verde y parecen algas, y sugieren ser como el origen de plantas animales en el Océano Pacífico y Nueva Escocia.

### **Clase Mastigophora. Flagelados**

La presencia de uno o más flagelos en algunos de los estadios de su ciclo de vida de los Mastigophora es característica de éstos. Estos flagelos le sirven como medio de locomoción y para capturar su alimento y quizás de sensores para percibir la presencia de otros.

Su cuerpo es usualmente una célula oval, o esférica, cubierta por una fina película y armadura en ciertos grupos tienen dos flagelos.

Algunos tienen coloración debido a pigmentos, éstos con clorofila pueden sintetizar alimento con ayuda de la luz solar, pareciendo plantas, por lo que a menudo son clasificadas como tales. Abundan en agua fresca y agua salada, donde junto a las diatomeas resultan la mayor parte de los alimentos de los animales acuáticos.

## II.- MANIFESTACIONES DE LA CIGUATERA

La intoxicación por Ciguatera se manifiesta en los humanos con una variedad de síntomas: neurotóxicos, gastrointestinales, cardiovasculares y otros.

Se considera que esta enfermedad es producida por varios Dinoflagelados asociados a una microflora que ha sido biomagnificada por etapas sucesivas en la cadena de alimentos marinos: peces herbívoros, peces carnívoros, moluscos y otros mariscos que han ingerido esos protozoos.

Estas toxinas incluyen ciguatoxinas (CTXs), maitoxinas (MTS), scaritoxinas (ScTx), gambiertoxinas y posiblemente otras sustancias como el ácido okadaico y sus compuestos.

La Ciguatoxina y algunos de sus compuestos han sido aislados del tejido muscular de varios peces de las especies *Gambierdicus toxicus*.

La Maitoxina fue aislada, por primera vez de las entrañas (intestinos, hígados) de pescados que mediante cirugía, presentaron esa toxina en su masa.

La Scaritoxina (ScTx) ha sido hallada en la carne o masa del pez cotorra. No obstante, la Ciguatoxina (CTX) y la Maitoxina (MTX) se han encontrado en el hígado e intestinos de pescados ciguaterados, lo que hace pensar que la Scaritoxina es un metabolito de la Ciguatoxina.

Se ha comprobado que la mayor cantidad de estas toxinas se encuentran en el hígado, cerebro, huevos, las gónadas, en una proporción de 100 veces mayor que en otra parte del tejido del pescado. La toxicidad es proporcional al tamaño del pez.

Un pez puede estar ciguatoado hasta por 30 meses sin aparentarlo, según expertos.

Se considera que los pescados de agua dulce no producen la ciguatera porque en estas aguas no se encuentran los Dinoflagelados que sintetizan la ciguatoxina.

En la República Dominicana se consideran zonas críticas: el Banco de Navidad y el Banco de la Plata. La costa de Barahona se considera exenta de ciguatera, probablemente por los escasos arrecifes coralinos de esas aguas marinas.

### **Peces dañinos de mayo a octubre**

Casabito

Nuteroperca Tigri

Medregal

Cojinua cola amarilla

Peje Rey

Morena (Vedada todo el año)

Picua

Bonito

Barracuda (picua)

El casabe

### **Pueden consumirse sin peligro**

Mero

Carite

Colirrubia

Bocallate

### **Peces que no deben ingerirse nunca**

Orbe

Pez cobre

Pez Ballesta  
Pez espino  
Pez lija  
Pez escaro  
Pez puerco espín

### III.- TRATAMIENTO

#### III.1.- Emergencia

Hace vomitar. Provocar el vómito introduciendo 2 dedos en la garganta o tomando jarabe de Ipecacuana.

El tratamiento sintomático para el paciente afectado por la Ciguatera, incluye lavado gástrico, purgante salino, antidepresivos tipo Diazepan, Amitriptina, Vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>.

Se atribuye a un grupo de científicos norteamericanos de las islas Marshall, encabezados por el Dr. Neal Palafox el haber descubierto el uso de la solución intravenosa de Manitol al 20%.

#### III.2.- Sintomatología de la intoxicación

Los síntomas comienzan a aparecer al cabo de 10 minutos y hasta 12 horas después de ingerir el pescado .

Se siente sabor metálico, náuseas, vómitos, diarreas, dolores: maxilares y de dientes, de estómago y musculares, malestar general, mareos, hormigueo de pies, de manos, adormecimiento de la boca y extremidades. Reversión en las sensaciones de frío y calor, dificultad para caminar, parestacia de las extremidades, ardor en los pies, astenia, alucinaciones, taquicardia, bradicardia, bloqueo cardíaco.

Se consideran dos teorías respecto del mecanismo de acción del Manitol:

- Una se refiere a la neutralización periférica de la toxina y su eliminación por vía renal.
- La otra se refiere a la inhibición competitiva a nivel de la membrana celular.

### **III.3.- Tratamiento con Manitol**

El tratamiento de la ciguatera mediante el Manitol ocurrió de manera accidental, al ser tratado un paciente con Manitol como diurético osmótico que desplazara agua del líquido intracelular y reducir la masa encefálica, en lo que se pensó se trataba de un edema cerebral, resultando ser considerado como tratamiento de primera elección en el caso de ciguatera, siempre y cuando se use adecuadamente y no existan contraindicaciones para el uso del Manitol.

#### *Administración*

La dosis inicial fue de 1 g (en sol. Al 20% de Manitol) por kg de peso.

0,5 g por Kg de peso en la segunda infusión.

Luego el Manitol a la dosis descrita fue diluido en 500 cc de solución salina y se administró en 3-4 horas.

En algunos pacientes fue necesaria la segunda infusión y se utilizó una segunda vía para hidratación.

En esa experiencia realizada, fueron dados de alta 10 pacientes a las 24 horas y un paciente a las 48 horas y tres pacientes fueron dados de alta a las 72 horas.

La administración intravenosa (I.V.) de Manitol produce rápido efecto sobre los ciguateros, remitiendo los síntomas sin necesidad de hospitalización y sin recaídas reportadas hasta ahora.

Se han reportado resultados favorables, por vía oral, cuando se ha administrado el Manitol al comienzo de la fase aguda.

Fundamentalmente todos los efectos del manitol parten de la siguiente base común:

Aumenta la osmolaridad extracelular, lo cual da como resultado un desplazamiento de agua del comportamiento intracelular al extracelular.

*Contraindicaciones:*

- Anuria con necrosis tubular severa, aguda bien establecida debida a enfermedad renal severa.

Si los pacientes no responden a la dosis de prueba, la acumulación puede llevar a sobreexpansión del líquido extracelular y sobrecarga circulatoria.

- Deshidratación severa.
- Hemorragia intracraneal activa, excepto durante la craneotomía. (El Manitol puede aumentar la hemorragia).
- Congestión pulmonar o edema pulmonar severo.

*Interacciones con otras drogas:*

- Glucósidos digitálicos: su uso con Manitol puede potenciar la posibilidad asociada con hipopotasemia.
- Otros diuréticos: incluyendo los inhibidores de la anhidrasa carbónica pueden potenciar los efectos diuréticos y de reducción de la presión intraocular cuando se usan simultáneamente con el Manitol.

*Farmacocinética:*

Absorción: la mayoría de los diuréticos osmóticos se absorben muy poco en el tracto gastrointestinal, por eso se prefiere usar la vía

parenteral endovenosa para lograr concentraciones plasmáticas efectivas y proporcionar una biodisponibilidad adecuada.

Metabolismo: En caso de metabolizarse lo hace en una pequeña proporción en el hígado a glucógeno.

Vida media: Aproximadamente es de 100 min.; puede aumentar a 36 horas en insuficiencia renal aguda.

Comienzo de la acción:

- Diuresis: 1-3 horas.
- Reducción de la presión del líquido cefalorraquídeo y líquido intraocular: 15 minutos.
- Tiempo hasta efecto máximo: reducción de la presión intraocular de 30-60 minutos después de la inyección.
- Duración de la acción: la reducción de la presión del líquido cefalorraquídeo es de 3 a 8 horas después de cesar la infusión. Reducción de la presión intraocular de 4 a 8 horas.

*Dosificación:*

Según la USP, un gramo de Manitol equivale a 5,5 mOsm. La cantidad de mOsm contenida en un litro de agua estéril para inyectable es:

% de Manitol	MOms/lt (aprox.)
5	275
10	550
15	825
20	1100
25	1375

El Manitol (osmitrol) viene para administrarse vía intravenosa. Se debe tomar en cuenta las soluciones de más de 15%, utilizar un filtro ya que tiende a cristalizarse sobre todo cuando se exponen a bajas

temperaturas. La dosis y concentración a usar depende del estado hídrico del paciente. Mientras más mínima es la dosis menos riesgos habrá de que ocurra un desbalance hidroelectrolítico, en el caso fatal de que esto ocurra se deberá acudir a la rehidratación hidroelectrolítica. En los pacientes con volumen plasmático y, previamente al tratamiento, se le hará una dosis de prueba que consiste en la administración de 200 mg/kg infundida durante 3 a 5 minutos como solución de 15 a 25% . Si la primera o segunda dosis no promueve un flujo urinario de 30 a 50 ml al cabo de 2 ó 3 horas debe reevaluarse al paciente.

#### IV.- INTOXICACIÓN PARALÍTICA POR INGESTIÓN DE MARISCOS. MAREA ROJA.

Marea roja es la denominación popular del crecimiento abundante y ocasional de organismos unicelulares en el mar. Las Mareas rojas son generalmente producidas por Dinoflagelados, que siguen un proceso de desarrollo gobernado por factores biológicos e hidrográficos específicos. Estos organismos son capaces de elaborar saxitoxinas, productos altamente tóxicos para otros organismos, tanto vertebrados como invertebrados, sensibles a ellos. Entre los Dinoflagelados tóxicos se mencionan los siguientes géneros: *Gonyaulax*, *Protogonyaulax*, *Ptyrosodiscus* y *Pirodinium*. Las Mareas rojas no necesariamente son tóxicas, ni siempre le dan una colaboración al agua del mar donde éstas ocurren.

Cuando se presenta este fenómeno natural, las pérdidas económicas son grandes. Puede ocurrir mortalidad masiva de peces y otras especies marinas. Es necesario emitir vedas de captura y de comercialización de pescados y mariscos. Las exportaciones de camarón pueden también verse afectadas.

La intoxicación paralítica por mariscos en humanos se produce por la ingestión de bivalvos portadores de las toxinas acumuladas en su organismo a través de procesos de alimentación por filtración. Los casos pueden ser leves o fatales, según la cantidad de toxina ingerida.

Entre octubre y diciembre de 1989 un brote de intoxicación paralítica por ingestión de mariscos (IMP) afectó a todo el Istmo Centroamericano y México.

En El Salvador se reportaron 106 casos y tres defunciones, la principal concentración de casos y defunciones ocurrió en La Perla, perto también se notificaron casos en Santa Tecla, en Zonte y Mizata. La investigación epidemiológica detectó asociación entre los casos y la ingestión de almejas. Estos moluscos examinados en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala fueron positivos para saxitoxinas en concentraciones por encima de 10.000 unidades ratón/100 g.

En México se registraron 99 casos, cuatro de los cuales fallecieron. En Guatemala, a pesar de las medidas preventivas tomadas, fueron reportados 7 casos de intoxicación en Las Lisas, Santa Rosa, todos se recuperaron sin secuela.

En todos los países del Istmo se alertó a la población sobre la ocurrencia; en Guatemala y El Salvador hubo veda de pesca de mariscos. Se colectaron muestras para exámenes toxicológicos y se estableció o reactivó el sistema de vigilancia epidemiológico.

El Ministerio de Salud de Guatemala estuvo organizando para el mes de octubre de 1990 una reunión subregional sobre el tema en la que estuvieron presentes representantes de los países Centroamericanos y México, además de otros expertos internacionales, a fin de intercambiar experiencias en cuanto a la prevención y control de los efectos de la Marea roja.

También se ha extendido esta gestión hacia la participación de cooperativas y gremios de pescadores artesanales.

## V.- INVESTIGACIÓN DE LA CIGUATOXINA

Un método empleado para la investigación de la Ciguatoxina es el Método “Hokama Stick Test”, el cual ha sido realizado en mi país en el Laboratorio Nacional de Salud Pública “Dr. Defilló” de Santo Domingo.

La Dra. Mirian Alburquerque de Blanchard, Jefe del Departamento de Toxicología de ese laboratorio, lo expone en su conferencia dictada en las VII Jornadas Farmacéuticas de la Escuela de Farmacia, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU) 5-7-8 de octubre de 1989. Santo Domingo, República Dominicana.

Esta técnica inmunolítica es rápida, específica y económica, no necesita instrumentos sofisticados para realizarla. La Dra. Alburquerque de Blanchard fue invitada por el Dr. Yohitsugi Hokama, bajo los auspicios de la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID) para recibir entrenamiento en esa metodología, la cual realizó en la Universidad de Hawai y Manoa en Octubre-Noviembre de 1987.

En esta técnica se usa corrector líquido sobre un palillo de bambú para absorber la ciguatoxina y otras biotoxinas análogas, que luego se demostrará la presencia en el desarrollo del método “Hokama Stick Test”. Las muestras empleadas fueron de las zonas costeras de la República Dominicana y obtenidas por el Laboratorio Nacional de Salud Pública Dr. Defilló, por el Departamento de Recursos Pesqueros de la Secretaría de Estado de Agricultura y por la Dra. Alburquerque de Blanchard en distintos sitios de expendio en la ciudad de Santo Domingo, República Dominicana.

Entre las especies que fueron analizadas están: la barracuda, el jurel, el chillo, cojinua, picua, pez loro, colirrubia, dorado, mero y otros.

En la clasificación de los pescados intervinieron la Lic. Nidia Terrero del Centro de Investigaciones de Biología Marina de la UASD y colaboraron en la investigación la Dra. Eva Ramírez Pérez, la Lic. Luisa Rodríguez de Casanova, la Lic. Griselda Batista Núñez y las estudiantes: Juana Rodríguez, Ramona Núñez y Carmen Bueno.

Este “Método Hokama Stick Test” fue respaldado por el Dr. Rafael González, Director entonces del “Laboratorio Dr. Defilló”.

Los reactivos empleados en este método son análogos a los usados por el Dr. Hokama en la detección de toxinas por el Método de Inmuno Análisis Enzimática (ELISA) que fue reportado en el 1983. Entre éstos, agua oxigenada al 30%, Solución. Tris Buffer A., Solución Tris buffer B, Solución de substrato de 4-cloro-1-naftol y otros.

*De interés:* Para realizar este método, las muestras del pescado deben estar limpias, no debe hacerse con muestras descompuestas.

Si se usa pescado congelado, debe descongelarse antes.

Debe evitarse el hacer pruebas en los intestinos y en los vasos sanguíneos.

#### PROGRAMAS INTERNACIONALES

Existen varios programas internacionales que están monitoreando el problema de las toxinas en alimentos del mar.

Estos grupos tienen información y proyectos de asistencia. Entre estos están:

- Oceanographic Comisión (IOC) de UNESCO.
- La OMS (Who)
- International on Chemical Safety (IPCS).
- Food and Agriculture Organization (FAO)
- The Scientific Committee Oceanographic Research (SCOR)
- The International Council for Exploration of the Sea (ICES).
- South Pacific Commission (SPC).

#### FUENTES

- Biblioteca Central de la Universidad Nacional Pedro Heriquez Ureña (UNPHU) Santo Domingo, R.D.

- Centro de Información de Drogas y de Intoxicaciones (CIDI) UNPHU, Santo Domingo, R.D.
- INDOTEC (Instituto Dominicano de Tecnología) Santo Domingo: R. D.
- Laboratorio Nacional de Salud Pública Dr. Defilló. Santo Domingo R.D.
- Memoria del Internacional Workshop on Ciguatera. 1995. Laboratorio de Salud Pública Dr. Defilló. Santo Domingo. R.D.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM).
- Secretaría de Estado de Agricultura. Subsecretaría de Recursos Naturales. Santo Domingo. República Dominicana.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ALBURQUERQUE, B.M. (1989) La Ciguatera y detección de la Ciguatoxina y otras toxinas polietéreas relacionadas en muestras de pescado procedentes de la costa de la República Dominicana. Por el Método Hokama Stick Test. 1989. Departamento de Toxicología. Laboratorio de Salud Pública Dr. Defilló. Santo Domingo, República Dominicana.
- (2) BATISTA M.; ROMERO, L.; GERADO, R. (1991) "Manitol como tratamiento de primera elección en la Ciguatera" Escuela de Medicina. UNPHU.
- (3) BERG, L.; VILLEE, C. (1996) Biología Vilee 3ª ed. MacGraw- Hill- Interamericana.
- (4) Ibidem (1998).
- (5) MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL (1989) *Boletín Epidemiológico* Vol. 24.
- (6) UNPHU (1987-1989) "Ciguatera" Recursos del CIDI. Santo Domingo República Dominicana.
- (7) COMPRÉS, L.; VARGAS, E. (1987) "Método Mac Millan et al." (1987) INDOTEC. Santo Domingo. República Dominicana.
- (8) COOK, JAMES (1777) Capitán del Navío en el Sur del Pacífico (en 1974).
- (9) Diccionario Médico Larousse. Ed. Larousse. París. B. Aires. Adaptación del Dr. Galtier Boissier.

- (10) Diccionario Ideológico de la Lengua Española. (1963) 2ª ed. Gustavo Gili S.A.
- (11) ESPEJO, B.; JOSÉ CASTRO, B.; RAFAEL, M. Tratamiento exitoso de Ciguatera con Manitol Endovenoso. Santo Domingo
- (12) FREMT, MARC. (1995) "Biotoxins Associated with Ciguatera Fish Poisoning" International Workshop on Ciguatera. Santo Domingo.
- (13) General Zoology, Tracy Storer, Robert L. Usinger. 4ª Ed. Copyright 1957-1965. Ed. Mc Graw-Hill, Inc. U.S.A.
- (14) GOLDSMITH, C.; HAWAI CHENTEC INTERNATIONAL (1995) "Ocurrence of Ciguatera Fish poisoning" International Workshop of Ciguatera. Santo Domingo. R.D.
- (15) GRAN SOPENA (1973) Diccionario Enciclopédico. Ed. Ramón Sopena. S.A.
- (16) International Workshop on Ciguatera (Nov. 8-10, 1995) Lab. Nacional de Salud Pública "Dr. Defilló" Santo Domingo. R.D. United Nations Scientific and Cultural Organization (UNESCO) Pág. 2, 4, 5, D.L. Park.
- (17) PEQUEÑO LAROUSSE ILUSTRADO García pelayo y Ramón Gross (1972) 8ª ed. Ediciones Larousse. París

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

\_\_\_\_\_Doctrina\_\_\_\_\_

## **Apoptosis en Adipocitos Marrones: Implicación en Obesidad y Cáncer\***

PALOMA NAVARRO, MANUEL BENITO, MARGARITA LORENZO

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de  
Farmacia.- Universidad Complutense de Madrid*

### RESUMEN

El mantenimiento de la homeostasis tisular consiste en un complejo balance entre los procesos de proliferación y muerte celular, aunque el balance resulta favorable a la apoptosis durante algunas etapas de la embriogénesis o durante la involución de tejidos adultos. La apoptosis es una muerte celular programada fisiológica que afecta a células individuales y no produce respuesta inflamatoria. Muchas enfermedades están asociadas con la inducción o inhibición de apoptosis, lo que conduce a una pérdida celular (desórdenes neurodegenerativos o daños isquémicos), o a la acumulación celular (cáncer o desórdenes autoinmunes). En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que responden al IGF-I/insulina aumentando la proliferación y la diferenciación celular. Nuestros resultados muestran que la ausencia de suero en una línea celular de adipocitos marrones da lugar a la inducción de apoptosis. Hemos visto que la inhibición de caspasas rescata a estas células de apoptosis disminuyendo la expresión de Bcl-x<sub>s</sub> y aumentando la de Bcl-2. La insulina y el IGF-I son factores de supervivencia para estas células a través de una ruta dependiente de PI 3-quinasa/Akt y de MAP-quinasa.

**Palabras clave:** Apoptosis.- Adipocitos.- Caspasas.- Insulina

### SUMMARY

**Apoptosis in Brown Adipocytes: Implication in Obesity and Cancer**

---

\* Premio de la Real Academia de Farmacia en el Concurso Científico de 1999.

The maintenance of tissue homeostasis is a complex balance between the rate of cell proliferation and the rate of cell death, although the balance favours apoptosis during some stages of embryogenesis or during the physiological involution of adult tissues. Apoptosis is a physiological programmed cell death that only affect individual cells and did not produce inflammatory response. Many diseases are associated with the induction or inhibition of apoptosis, that leads to cell loss (neurodegenerative disorders or ischemic injury), or cell accumulation disorders (cancer or autoimmune disorders). In our laboratory, we have developed a model of non fibroblastic mesenchymal cell, the foetal brown adipocytes, that respond to IGF-I/insulin increasing cellular proliferation and differentiation. Our results show that serum deprivation in a brown adipocyte cell line induces apoptosis. The inhibition of caspases rescues these cells from apoptosis, decreasing the expression of Bcl-x<sub>s</sub> and increasing Bcl-2 expression. Insulin and IGF-I are survival factors in these cells through a PI 3-kinase/Akt and MAPK-dependent pathway.

**Key words:** Apoptosis.- Adipocytes.- Caspases.- Insulin

## INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis tisular consiste en un complejo balance entre los procesos de proliferación y muerte celular, aunque el balance resulta favorable a la apoptosis durante algunas etapas de la embriogénesis o durante la involución de tejidos adultos. La apoptosis es una muerte celular programada fisiológica que se diferencia de la necrosis (muerte patológica) en que solamente afecta a células individuales y no produce respuesta inflamatoria. Muchas enfermedades están asociadas con la inducción o inhibición de apoptosis, lo que conduce a una pérdida celular (desórdenes neurodegenerativos o daños isquémicos), o a la acumulación celular (cáncer o desórdenes autoinmunes). La apoptosis también tiene lugar en condiciones anormales, como son la exposición a radiaciones, a quimioterápicos o algunas toxinas.

La apoptosis está caracterizada por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, que incluyen la aparición de protuberancias en la membrana plasmática, externalización de la fosfatidilserina, ruptura de láminas nucleares y de la poli (ADP-ribosa) polimerasa, condensación de la cromatina y ruptura del ADN y finalmente fragmentación de las

células dando lugar a los cuerpos apoptóticos (1,2). En este sentido, la técnica más representativa para el estudio de la apoptosis es el análisis bioquímico de las “escaleras” de ADN extranuclear: la apoptosis se acompaña con frecuencia de la ruptura del ADN celular en múltiplos de 180 pb, correspondientes al tamaño de los nucleosomas, y es esta escalera de 180 pb lo que se puede observar al realizar una electroforesis del ADN (3). El análisis por citometría de flujo del ADN celular tras la tinción con yoduro de propidio permite el análisis de las fases del ciclo celular así como de los picos hipodiploides, característicos del proceso apoptótico. Otros parámetros, como la detección de la muerte celular *in situ* mediante la técnica del TUNEL, o la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular mediante la unión de Anexina-V también se pueden medir por citometría de flujo (2)

Los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis no se conocen completamente. Se ha visto la implicación de dos familias de proteínas: los miembros de la familia de cisteín proteasas relacionadas con la enzima convertidora de interleuquina 1- $\beta$  (también denominadas caspasas), y las proteínas de la familia de Bcl-2. Las **caspasas** son ejecutoras de apoptosis, siendo responsables de la ruptura proteolítica de muchas proteínas clave, como la poli (ADP-ribosa) polimerasa, la actina asociada a la membrana, o las láminas de la envoltura nuclear, lo que precipita los dramáticos cambios morfológicos de la apoptosis (4). Las caspasas actúan jerárquicamente de manera que algunas caspasas rompen tras residuos específicos de aspartato, activando otras caspasas (5). La activación de las caspasas supone un punto principal para el control de la apoptosis. Para estudiar el papel de las caspasas en el proceso apoptótico, se han desarrollado numerosos inhibidores irreversibles como Z-VAD.fmk (6). Este compuesto inhibe los procesos bioquímicos y morfológicos asociados con la apoptosis en varios sistemas celulares. La **familia Bcl-2** está compuesta por una serie de genes que juegan un papel crítico en el control de la integridad mitocondrial. Algunos miembros de la familia como Bax, Bak y Bad son inductores de apoptosis. En cambio, la expresión de otros miembros como Bcl-2 y Ced-9 pueden prevenir la apoptosis. Bcl-x, otro miembro de la familia Bcl-2, durante su procesamiento, da lugar a dos proteínas, Bcl-X<sub>L</sub>, antiapoptótica, y Bcl-X<sub>S</sub>, apoptótica (7). Diversos estudios han sugerido que Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2 llevan

a cabo su acción antiapoptótica en paralelo o antes del procesamiento de determinadas caspasas a su forma activa, mientras que la expresión ectópica de Bak induce la apoptosis en fibroblastos a través de mecanismos que pueden ser inhibidos por Z-VAD.

La mayoría de las células en los animales superiores necesitan una estimulación trófica continua para sobrevivir, en consecuencia tras la retirada de factores de crecimiento la mayoría de las células mueren por apoptosis, aunque el aporte de factores específicos (principalmente de la familia de receptores tirosina quinasa) previene este proceso. Factores como IGF-I, insulina, EGF, PDGF, NGF tienen vías de señalización que previenen la apoptosis, a través de la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa. Por debajo de la PI 3-quinasa la supervivencia celular parece depender de la serina treonina protein quinasa Akt/PKB, ya que esta enzima fosforila e inactiva Bad, una proteína proapoptótica (8,9). Además la activación de MAP quinasa quinasa (MEK) es necesaria para el rescate de apoptosis por el IGF-I en células PC-12 privadas de suero (10).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de células mesenquimales no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que responden al IGF-I/insulina aumentando la proliferación y la diferenciación celular. El tejido adiposo marrón (BAT) está activo durante el periodo perinatal, tras la exposición al frío, tras los periodos de hibernación o como respuesta a determinadas dietas. Los mecanismos que dan lugar a la desaparición del BAT no se conocen claramente, aunque no se descarta la posibilidad de que se produzca por un proceso de apoptosis. Utilizando líneas celulares derivadas de adipocitos marrones fetales de rata, en el presente trabajo nos propusimos estudiar los mecanismos de inducción de apoptosis, así como los genes implicados y la posible actuación de la insulina/IGF-I como factores de supervivencia.

## RESULTADOS

*1.- EFECTO APOPTÓTICO DE LA RETIRADA DE SUERO EN LOS ADIPOCITOS MARRONES INMORTALIZADOS: IMPLICACIÓN DE LAS CASPASAS*

En nuestro laboratorio, disponíamos de distintas líneas celulares procedentes de adipocitos marrones inmortalizados (11), que se emplearon para profundizar en el estudio de los mecanismos de proliferación y diferenciación del tejido adiposo marrón (12,13,14). Uno de los hechos que pudimos observar, fue que, a pesar de que los adipocitos marrones primarios parecían ser resistentes a la muerte celular tras el cultivo prolongado en ausencia de suero (15,16), al cultivar los adipocitos marrones inmortalizados (células MB 4.9.2) en ausencia del mismo, se despegaban de la placa de cultivo y morían. La detección de determinadas características en estas células, como la presencia de células con contenido en ADN inferior a 2C, o la fragmentación nuclear y del ADN, nos permitió confirmar que se estaba produciendo un proceso de

apoptosis. Un ejemplo de ambas técnicas aparece en las Figuras 1 y 2.

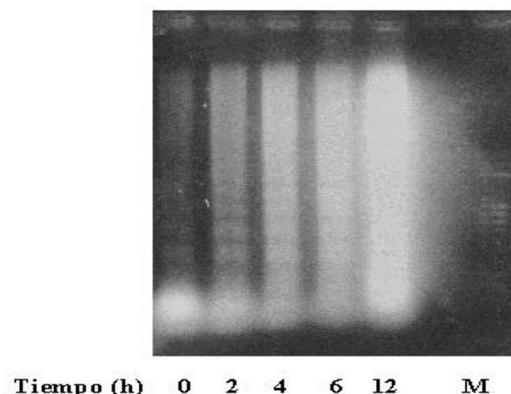


Figura 2.- Fragmentación del ADN de adipocitos marrones inmortalizados en ausencia de suero: Los adipocitos marrones inmortalizados crecieron en presencia de suero, y posteriormente se cultivaron en ausencia del mismo durante distintos tiempos. A continuación se realizó la extracción del ADN extranuclear y se procedió a su análisis electroforético en gel de agarosa. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. En el último carril se muestra un marcador de peso molecular (M) (escalera de ADN de 100 pb).

Se ha podido observar que en determinados tipos celulares, la ausencia de suero o factores de crecimiento induce la activación de caspasas (17). Este es el caso de las células PC12, en las que la retirada de suero da lugar a un proceso apoptótico en el que se produce la activación de la caspasa-2 (18). Para comprobar la importancia de esta activación en los adipocitos marrones inmortalizados, empleamos un inhibidor irreversible de caspasas, el carbobenzoxi-Val-Ala-Asp-fluorometil cetona (Z-VAD). La disminución en el porcentaje de células hipodiploides o en la fragmentación del ADN tras el tratamiento con Z-VAD, nos indicó que la apoptosis que tenía lugar en las células MB 4.9.2 tras la retirada de suero, estaba mediada por las caspasas. La medida de otros parámetros como la incorporación de nucleótidos marcados al ADN (ensayo TUNEL) o la unión de Anexina-V, corroboró estos resultados.

En un intento de seguir caracterizando la apoptosis que tenía lugar en los adipocitos marrones inmortalizados, decidimos ver si el proceso era dependiente de la síntesis proteica o no. La implicación de la síntesis de

proteínas *de novo*, se ha podido estudiar empleando un inhibidor de dicho proceso, como es la cicloheximida. Nuestros datos demuestran que, en los adipocitos marrones immortalizados, el desarrollo de apoptosis no está ligado a la síntesis proteica, ya que la cicloheximida fue incapaz de bloquear el proceso.

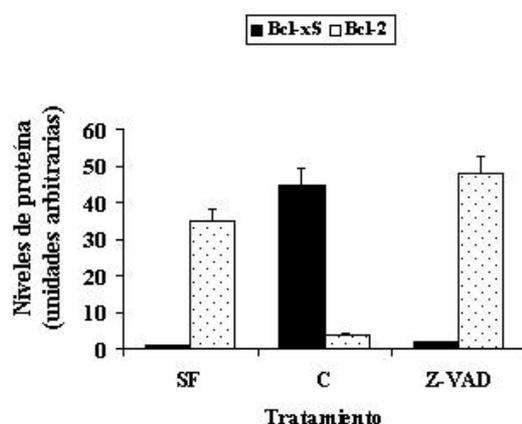


Figura 3.- Niveles de proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2: Los histogramas representan los niveles de las proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2 en unidades arbitrarias, y son medias  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

Los numerosos estudios realizados sobre las caspasas, han demostrado que estas son capaces de actuar en diferentes puntos del proceso de muerte celular. Varios autores han propuesto que estas proteasas podrían actuar sobre reguladores negativos de la apoptosis, como por ejemplo determinados miembros de la familia Bcl-2 (19,20). El estudio de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x en nuestro sistema, mostró la inducción de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> (forma pro-apoptótica de Bcl-x) en ausencia de suero y la disminución paralela del contenido de la proteína Bcl-2. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor Z-VAD, provocó el proceso inverso, es decir, se produjo una disminución de Bcl-x<sub>S</sub> y un aumento de Bcl-2. Un ejemplo de la expresión de estas proteínas se puede observar en la Figura 3. La familia Bcl-2 incluye varios genes que juegan un papel fundamental en el control de la integridad mitocondrial. En muchos procesos apoptóticos es característica la

alteración del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En este sentido, nosotros decidimos examinar el  $\Delta\Psi_m$  en nuestras células, en condiciones de crecimiento (presencia de suero) y de apoptosis (ausencia de suero), así como bajo el tratamiento con Z-VAD. El potencial de membrana se midió por la fluorescencia de la Rodamina 123 (rh123). La ausencia de suero dio lugar a una disminución del potencial de un 20% a las 12h y de un 40% a las 24h, indicando que el proceso apoptótico estaba acompañado de una despolarización mitocondrial. Sin embargo el tratamiento con Z-VAD previno totalmente esta pérdida de  $\Delta\Psi_m$ .

## *2.- LA SOBREENPRESIÓN DE H-RAS INDUCE APOPTOSIS EN LOS ADIPOCITOS MARRONES EN AUSENCIA DE SUERO: ASOCIACIÓN DE BCL-2 CON RAS Y RAF-1*

Otra línea celular adipocítica con la que trabajamos en nuestro laboratorio es la denominada MB 1.3.19. Se trata de adipocitos marrones inmortalizados y transformados por transfección con una construcción permanentemente activa de H-Ras (11). Al realizar nuestros primeros experimentos con estas células, pudimos observar, que al igual que en las células MB 4.9.2, la ausencia de suero daba lugar al despegue de las células de la placa de cultivo. Comparando ambas líneas celulares, vimos que los efectos de la ausencia de suero eran más rápidos en las células transformadas que en las inmortalizadas.

Para comprobar si el mayor índice de apoptosis encontrado en las células transformadas (MB 1.3.19) era debido a la sobreexpresión del gen *H-ras* transformado, procedimos a transfectar transitoriamente por el método del  $\text{PO}_4\text{Ca}$ , las células inmortalizadas (MB 4.9.2) con un plásmido que contenía un mutante activo del gen *H-ras* (pMEXneo *H-ras*<sup>lys12</sup>) o con el vector vacío (pMEXneo). Los experimentos de transfecciones transitorias en las células MB 4.9.2, con una construcción activa de H-ras, y el posterior análisis del ciclo celular y de la fragmentación del ADN, demostraron que la sobreexpresión de Ras transformado daba lugar a una apoptosis masiva en los adipocitos marrones en ausencia de suero.

Ya que habíamos visto que la sobreexpresión del gen *ras* transformado inducía apoptosis en adipocitos marrones transfectados tanto permanente como transitoriamente, decidimos bloquear la vía Ras/Raf-1/MEK1/MAP-quinasa para intentar rescatar estas células de la muerte apoptótica. Para ello las células MB 1.3.19 se transfectaron transitoriamente con construcciones dominantes negativas de Ras ( $\Delta$ Ras) y Raf-1 ( $\Delta$ Raf), (pMEXneo-H-ras<sup>asn17</sup> y pMNC-raf<sup>trp375</sup>) o con el vector vacío (pMEXneo). Los resultados obtenidos tras la transfección de un mutante dominante negativo de *ras* ( $\Delta$ Ras) y de *raf* ( $\Delta$ Raf) en las células MB 1.3.19 dio lugar a una disminución de las células hipodiploides, de la fragmentación del ADN.

El siguiente paso fue el bloqueo de la ruta Ras/Raf/MEK/MAP-quinasa utilizando un inhibidor específico de la activación de MEK-1 por Raf-1, el PD098059 (21). Las células MB 1.3.19 fueron incubadas durante 6h en medio libre de suero tanto en ausencia como en presencia de PD098059 30  $\mu$ M, y posteriormente fueron recogidas para determinar las células con contenido en ADN inferior a 2C, así como la existencia de ADN fragmentado por electroforesis. La presencia de PD098059 aumentó significativamente el porcentaje de células hipodiploides con respecto a los adipocitos marrones cultivados simplemente en ausencia de suero. De la misma manera, el tratamiento con el inhibidor dio lugar a un aumento en la fragmentación del ADN, observada al realizar una electroforesis del ADN extranuclear.

Los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis no están todavía demasiado claros, aunque se conocen varias proteínas, como los miembros de la familia Bcl-2, que parecen estar implicadas en el control de este proceso. Dentro de esta familia, hay proteínas con actividad anti-apoptótica, y otras que actúan promoviendo la muerte celular. Basándonos en trabajos anteriores en los que se había relacionado a las proteínas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> con Ras y Raf (22,23,24), decidimos estudiar la posible interacción de estas proteínas en nuestro sistema. Nuestros resultados demostraron que, en condiciones no apoptóticas (presencia de suero o de  $\Delta$ Ras o  $\Delta$ Raf), en las células MB 1.3.19, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 predominaba frente a la expresión de la proteína pro-apoptótica Bcl-x<sub>S</sub>. Sin embargo, en condiciones apoptóticas

(ausencia de suero), los niveles de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> aumentaban considerablemente, a la vez que disminuía el contenido en Bcl-2. Además, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación demostramos que el Bcl-2 presente en la célula tras la retirada de suero, estaba asociado a Ras y Raf, y que esta asociación se producía a través de una forma de Bcl-2 fosforilada en serina/treonina. Por otra parte, mediante experimentos de inmunoprecipitación, demostramos la triple asociación entre Ras, Raf y Bcl-2, y que además, en ausencia de suero, el Bcl-2 asociado a Ras estaba fosforilado en serina/treonina y posiblemente inactivo.

### *3.- LA INSULINA Y EL IGF-I RESCATAN DE APOPTOSIS A LOS ADIPOCITOS MARRONES INMORTALIZADOS: SEÑALIZACIÓN IMPLICADA*

Para estudiar el posible papel de la insulina/IGF-I como factores de supervivencia en los adipocitos marrones inmortalizados (células MB 4.9.2), procedimos a cultivar las células durante 6h en medio libre de suero en presencia de distintas concentraciones de insulina e IGF-I, para analizar posteriormente la existencia de ADN extranuclear fragmentado. El tratamiento de los adipocitos marrones inmortalizados con insulina e IGF-I, fue capaz de revertir la apoptosis inducida por la ausencia de suero, lo que se comprobó tanto por la disminución del número de células hipodiploides, como por la desaparición de la fragmentación del ADN. Además los dos factores permitieron a las células entrar en el ciclo celular, que había quedado parado en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> tras la retirada de suero.

En cuanto a la señalización implicada en los efectos anti-apoptóticos de los factores de supervivencia, hay muchos trabajos que indican que el inhibidor de la PI 3-quinasa, wortmanina, bloquea la protección de NGF, PDGF o IGF-I/insulina en células PC-12 privadas de suero. En nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente la estimulación de la actividad enzimática de la PI 3-quinasa en adipocitos primarios e inmortalizados tratados con IGF-I e insulina (13,25). Para determinar si el efecto de la insulina y del IGF-I en la inhibición de apoptosis implicaba a la vía de la PI 3-quinasa, utilizamos el inhibidor

específico wortmanina, que se une a la subunidad catalítica p110 de la PI 3-quinasa, inhibiéndola, así como un inhibidor estructuralmente no relacionado, como es el LY294002 (26,27). Ambos inhibidores bloquearon la estimulación de la actividad PI 3-quinasa por la insulina en los adipocitos marrones inmortalizados, a las mismas dosis que se habían observado anteriormente en los adipocitos marrones primarios (32).

El siguiente paso fue comprobar si la wortmanina inhibía la acción de la insulina y del IGF-I en la prevención de la fragmentación del ADN. Se pudo observar que la wortmanina bloqueaba el efecto anti-apoptótico de la insulina de una forma dependiente del tiempo, alcanzando su efecto máximo a la misma concentración que producía la total inhibición de la actividad PI 3-quinasa. A esa misma dosis, la wortmanina también inhibió la acción anti-apoptótica del IGF-I. Además, el otro inhibidor, LY294002 10  $\mu$ M, fue capaz de anular también el rescate de apoptosis de la insulina.

Por otra parte, basándonos en el hecho de que la insulina/IGF-I necesitan la activación de la ruta Ras/Raf/MEK/MAP-quinasa para inducir la proliferación de los adipocitos marrones, y que los factores mencionados rescatan de apoptosis aumentando el número de células en ciclo, estudiamos el papel de la activación de MAP-quinasa en este efecto anti-apoptótico. El bloqueo de la fosforilación de p42/p44 MAP-quinasa, mediante la inhibición de MEK con el inhibidor PD098059, bloqueó el efecto protector de la insulina, aumentando la fragmentación del ADN y el porcentaje de células hipodiploides, y disminuyendo las células en ciclo.

Ya habíamos visto que, en concreto en nuestro sistema, la proteína Bcl<sub>x<sub>S</sub></sub>, estaba estrechamente relacionada a la inducción de apoptosis en ausencia de suero. Considerando este hecho, estudiamos la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub> por Western blot en lisados de adipocitos marrones inmortalizados tratados en las mismas condiciones anteriores. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de la muerte celular por insulina en los adipocitos marrones inmortalizados, estaba asociada a una disminución en la expresión de Bcl-x<sub>S</sub>, disminución que resultaba anulada por el bloqueo de la PI 3-quinasa y de la MAP-quinasa.

Continuando con la cascada de señalización que conducía a la supervivencia de los adipocitos marrones cultivados en ausencia de suero,

tras la estimulación con insulina, estudiamos el efecto de dos de las dianas de la PI 3-quinasa: la p70S6-quinasa (p70<sup>S6k</sup>), y la proteína quinasa B (PKB/Akt). Nuestros resultados mostraron que, aunque la p70<sup>S6k</sup> resultaba fosforilada, y por tanto activada tras la estimulación con insulina, su inhibición mediante el uso del inhibidor específico rapamicina, no impedía el efecto protector de la insulina. Esto quedó comprobado tanto por el estudio de la fragmentación del ADN, como por el porcentaje de células hipodiploides.

Para estudiar el efecto de la Akt/PKB en nuestro sistema celular, recurrimos a las transfecciones transitorias con construcciones dominantes negativas o activas de Akt. Tras la realización de las transfecciones, llevamos a cabo distintos ensayos que nos permitieron confirmar la implicación de la Akt/PKB en la vía de señalización que conduce a la supervivencia celular. Por una parte, la transfección con la construcción permanentemente activa de Akt (PKB<sup>gag</sup>), produjo efectos similares a los observados en presencia de insulina: disminución del porcentaje de células con contenido en ADN inferior a 2C, y disminución del número de núcleos apoptóticos. Sin embargo, la transfección con la construcción dominante negativa de Akt (PKB-CAAX), bloqueó el rescate inducido por la insulina, de una forma similar a como lo hacía el inhibidor de PI 3-quinasa, LY294002, o la transfección con un dominante negativo de la subunidad reguladora de la PI 3-quinasa,  $\Delta p85$ .

## DISCUSIÓN

El BAT está especializado en la producción de calor por un mecanismo denominado “termogénesis sin tiriteo”. Este tejido está activo durante el periodo perinatal, tras la exposición al frío, tras los periodos de hibernación o como respuesta a determinadas dietas. El desarrollo embrionario del BAT requiere la existencia de un balance entre los procesos de proliferación y apoptosis. No se conoce mucho sobre los reguladores negativos del BAT, y de las señales implicadas en la inactivación o desaparición del tejido. Recientemente se ha visto que el TNF- $\alpha$ , capaz de inhibir la diferenciación del tejido adiposo blanco, tiene un papel importante como regulador negativo del BAT por diferentes

mecanismos. Así, se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  induce apoptosis e inhibe el crecimiento celular en adipocitos marrones de rata (16,28).

En el suero hay numerosos factores y citoquinas que permiten la proliferación y la supervivencia de las células, de manera que la supresión del aporte de estas sustancias, puede dar lugar a la muerte celular. La inducción de un proceso apoptótico en células privadas de suero o de factores de crecimiento específicos, se ha comprobado en numerosos sistemas celulares (29,30,31,32). Nuestros datos demostraban que los adipocitos marrones inmortalizados eran sensibles a la retirada de suero, a diferencia de los adipocitos marrones primarios, donde la ausencia de suero era incapaz de inducir el proceso apoptótico. Además, en nuestro caso, la muerte celular programada parecía estar estrechamente relacionada con una parada del ciclo celular. Aunque, en principio, la progresión a través del ciclo celular no es necesaria para la muerte celular programada, la tendencia de las células a morir por apoptosis depende frecuentemente de su estado de diferenciación.

Para estudiar la posible participación de las caspasas en nuestro sistema, decidimos intentar prevenir la apoptosis inducida en ausencia de suero empleando un inhibidor irreversible de caspasas, como es Z-VAD(6). Nuestros datos nos hacen pensar que la inhibición de caspasas es capaz de bloquear determinadas características bioquímicas y morfológicas asociadas con la apoptosis, como son la fragmentación del ADN o la pérdida de la asimetría de la fosfatidilserina, lo que está de acuerdo con los trabajos aparecidos recientemente de McCarthy y col. (1997) (33). Además, los resultados parecen indicar que la activación de caspasas a través de un mecanismo inhibible por Z-VAD, es un suceso temprano en el desarrollo de apoptosis en los adipocitos marrones inmortalizados. Por otra parte, en los adipocitos marrones inmortalizados, la cicloheximida no previene la muerte celular programada, ni la supresión de la actividad proteásica en estas células, lo que parece indicar que todo el proceso es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, y que por tanto la maquinaria apoptótica existe previamente en la célula, posiblemente en un estado de inactivación, a la espera de un estímulo adecuado que fuera capaz de activarla, en este caso, la retirada de suero.

En nuestro sistema celular, se vio claramente, que las caspasas actuaban por encima de proteínas como Bcl-2 y Bcl-x<sub>S</sub>, regulando su expresión, lo que parecía estar de acuerdo con lo expuesto recientemente por Xue y Horvitz (1997) (18). En este trabajo se proponía que las caspasas serían capaces de romper la proteína Bcl-2, dando lugar a fragmentos que a su vez inducirían apoptosis. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se sugiere la existencia de una cisteína proteinasa capaz de romper Bcl-2, lo que podría regular la función de Bcl-2, contribuyendo a la inducción de apoptosis (34). Tanto las proteínas de la familia Bcl-2 como las caspasas, tienen una estrecha relación con la mitocondria (39). Pudimos comprobar, que en los adipocitos marrones inmortalizados, el cultivo en ausencia de suero, daba lugar a una disminución del potencial mitocondrial, disminución que podía evitarse mediante la inhibición de caspasas con Z-VAD.

Por tanto, todo parecía indicar que, en el contexto de los adipocitos marrones inmortalizados, la apoptosis inducida por la ausencia de suero, era dependiente de la activación de caspasas. Estas, por otra parte, daban lugar a alteraciones en la membrana mitocondrial, lo que a su vez, por la liberación de otros factores, podría provocar la activación de nuevas caspasas, creando así un mecanismo de retroalimentación. En nuestro sistema celular, la presencia de Bcl-x<sub>S</sub> en ausencia de Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>, podría contribuir también a la despolarización mitocondrial.

La señalización intracelular implicada en la inducción de apoptosis tras la retirada de suero/factores de crecimiento, no se conoce claramente, debido principalmente a la gran variabilidad existente entre unos sistemas celulares y otros. Los experimentos que llevamos a cabo en la línea celular de adipocitos marrones transformados por *H-ras* (células MB 1.3.19), nos mostraron la implicación de las proteínas Ras/Raf-1 en la señalización que conduce a la apoptosis en estas células. Al comparar las células inmortalizadas (MB 4.9.2) con las transformadas (MB 1.3.19), el aumento en el porcentaje de células hipodiploides, en la fragmentación del ADN y en la presencia de núcleos apoptóticos, nos indicó que en las células transformadas había una mayor incidencia de apoptosis.

El papel que juega Ras en el proceso apoptótico es muy controvertido, pudiendo realizar funciones opuestas dependiendo del

sistema celular o del estímulo inductor de la muerte celular. Los mecanismos por los que Ras protege de apoptosis se han relacionado con la activación de la ruta PI 3-quinasa/Akt, de la ruta Raf/MAP-quinasa y con la expresión de Bcl-2. Por otra parte, los trabajos que implican a Ras en la inducción de apoptosis son cada vez más abundantes. La implicación de Raf en apoptosis resulta tan controvertida como la de Ras. Parrizas y col. (1997) (24), demostraron que la apoptosis inducida en células que sobreexpresaban la proteína Crk-II, estaba mediada por Ras, pero era independiente de Raf. Sin embargo, los experimentos de Kauffmann-Zeh y col. (1997) (37) y Liu y col. (1998) (38), proponían un mecanismo de muerte celular en el que estaban implicados Ras y Raf.

Al realizar la transfección transitoria en las células MB 1.3.19 con  $\Delta$ Raf, comprobamos que nuestro sistema celular, se comportaba según el segundo modelo propuesto. Así, pudimos observar que la presencia de  $\Delta$ Raf, daba lugar a los mismos efectos que  $\Delta$ Ras, es decir, se produjo una disminución en el porcentaje de células con contenido en ADN inferior a 2C, así como un descenso de la fragmentación del ADN, todo lo cual indicaba que se había producido una reversión del proceso apoptótico. Sin embargo, el bloqueo de la vía MEK/MAP-quinasa con el inhibidor PD098059, no dio lugar a la desaparición de la muerte celular programada lo que parecía sugerir la existencia de dos rutas de señalización distintas a partir de Raf, una anti-apoptótica (MEK/MAP-quinasa) y otra apoptótica, hasta el momento desconocida. El balance de las dos vías, estaría regulado por el suero y/o factores de crecimiento, de manera que en presencia de los mismos, el efecto anti-apoptótico de MEK/MAP-quinasa, predominaría frente a la señalización apoptótica en la que estarían implicadas Ras/Raf. Pero la ausencia de suero y/o factores de crecimiento, potenciaría esta última vía, dando lugar a la muerte celular.

Si nos fijamos en la bibliografía aparecida en los últimos años, podremos encontrar numerosas evidencias de la interacción entre Ras, Raf y Bcl-2 (22, 23, 39). De acuerdo con nuestros resultados, diversos autores han presentado datos que demuestran la asociación de Bcl-2 con Raf-1, p21<sup>ras</sup> o p23<sup>R-Ras</sup> (22, 23), relacionando la asociación de p21<sup>ras</sup> y Raf con

Bcl-2, con la fosforilación de este, y con el bloqueo de la protección frente a la apoptosis inducida por esta proteína (23) (Figura 4).

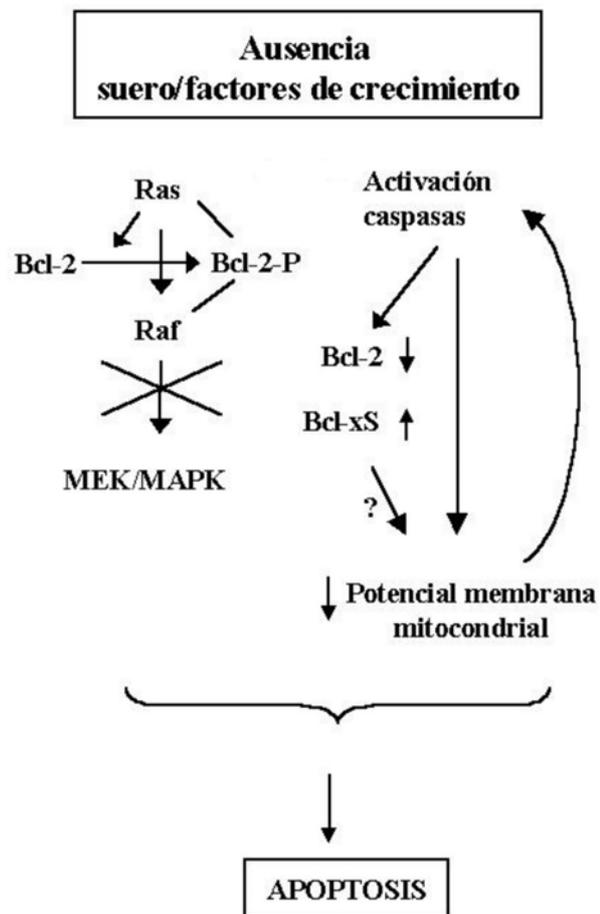


Figura 4.- Representación del modelo de apoptosis inducido por la ausencia de suero en las líneas celulares de adipocitos marrones

El balance entre la vida y la muerte requiere la presencia de señales extracelulares (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento). La mayoría de las células en cultivo mueren por apoptosis en ausencia de suero y/o factores de supervivencia, pero es posible prevenir esta muerte celular mediante el aporte de factores específicos, como la insulina, IGF-I, IGF-II, NGF, EGF (32,40,41,42). Considerando el alto número de receptores de insulina e IGF-I presentes en las células MB 4.9.2 (25), estudiamos el posible efecto de supervivencia que podrían ejercer estos factores frente a la apoptosis inducida por retirada de suero.

La unión de la insulina/IGF-I a su receptor, da lugar a la activación de distintas cascadas de señalización, a través de las cuales es capaz de mediar en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. La estimulación de la actividad PI 3-quinasa por insulina en los adipocitos marrones primarios e inmortalizados, ya había sido demostrada previamente (13,25). Nuestros resultados demostraron además que wortmanina y LY294002 eran capaces de bloquear esta estimulación en las células MB 4.9.2, a las mismas dosis que lo hacían en las células primarias (25), y que este bloqueo impedía a la insulina ejercer su efecto de protección frente a la apoptosis inducida por la retirada de suero. Tanto la wortmanina como el LY294002 en presencia de insulina, disminuyeron el porcentaje de células en ciclo, indicando que esta ruta era necesaria para la progresión del ciclo celular y para la supervivencia de los adipocitos marrones inmortalizados.

El papel de la ruta de Ras/Raf/MEK1/MAP-quinasa en apoptosis, como sucede en otros casos es contradictorio. En líneas generales, se implica a las MAP-quinasas en las rutas de supervivencia. Nuestros resultados mostraron que el PD098058, inhibiendo la fosforilación de MAP-quinasa, bloqueaba el rescate inducido por la insulina de una forma similar a la wortmanina/LY294004, inhibidores de PI 3-quinasa. Dado que la wortmanina no inhibe la estimulación de MAP-quinasas por insulina, y que el PD098059 no afecta la actividad PI 3-K estimulada por insulina, nuestros resultados demuestran claramente que la insulina lleva a cabo su función como factor de supervivencia en los adipocitos

marrones inmortalizados, por medio de dos rutas alternativas, como son la PI 3-quinasa y MAP-quinasas.

La importancia de la expresión de Bcl-x en el control de apoptosis por IGF-I/insulina, es un tema controvertido. La inhibición de apoptosis por IGF-I en células PC12, parece estar asociado a un aumento en la expresión de la proteína Bcl-x<sub>L</sub> (24), aunque por otra parte, la supresión de la apoptosis mediada por ICE, inducida por IGF-I en células COS, es independiente de la expresión de Bcl-x. Por lo tanto, vemos que, si bien la proteína Bcl-x<sub>L</sub> no está claramente expresada en este sistema celular, y por tanto no juega ningún papel relevante en él, se puede observar una regulación de la forma pro-apoptótica, Bcl-x<sub>S</sub> en todos los procesos relacionados con la muerte celular inducida por la ausencia de suero o con el rescate de dicha muerte por factores específicos.

Dos de los principales efectores de la PI 3-quinasa son la PKB/Akt y la p70<sup>S6k</sup>. En trabajos muy recientes se ha sugerido que la PKB/Akt está implicada en la regulación de la supervivencia celular en diferentes tipos celulares (38,44,45). Sin embargo, la participación de la p70<sup>S6k</sup> en los procesos de supervivencia no parece estar tan clara (38). La supervivencia inducida por la insulina, demostró ser independiente de p70<sup>S6k</sup> en los adipocitos marrones inmortalizados ya que su inhibición por rapamicina no impedía el efecto protector de la insulina.

Los efectos de PKB/Akt en apoptosis parecen estar mucho más claros. En los últimos años ha aparecido un gran número de trabajos implicando a esta quinasa en la regulación de la supervivencia celular en diferentes sistemas celulares (38,44,45). Nuestros resultados mostraron que la PKB, en los adipocitos marrones inmortalizados, estaba claramente activada por la insulina. Además, esta activación se producía a través de la PI 3-quinasa, pero no a través de p70<sup>S6k</sup>. Estos resultados están de acuerdo con otros aparecidos en la bibliografía, en los que se considera a la PKB como un mediador de la cascada de señalización de la PI 3-quinasa (46,47,48). Recientemente, Somwar y col. (1998) (49), han propuesto un mecanismo bifásico para la activación de la p70<sup>S6k</sup> por insulina, según el cual la estimulación inicial de la insulina daría lugar a la activación de la p70<sup>S6k</sup> por una vía PI 3-quinasa-dependiente, mientras

que en una segunda fase de la estimulación, la activación de la quinasa continuaría, pero esta vez por una vía independiente de PI 3-quinasa.

En resumen, los datos aquí expuestos, muestran que la insulina/IGF-I, además de ser fundamentales en los procesos de proliferación y diferenciación en los adipocitos marrones, constituyen importantes señales de supervivencia. Estos factores ejercen su efecto protector frente a la apoptosis inducida por la ausencia de suero a través

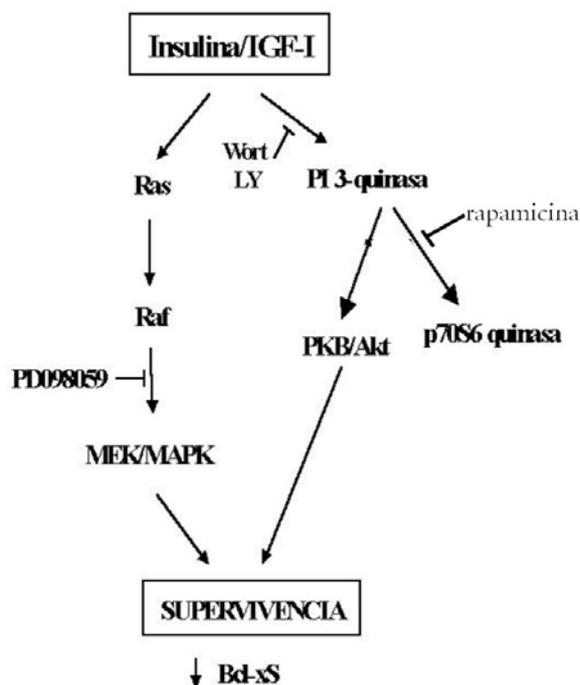


Figura 5.- Modelo de supervivencia inducido por insulina/IGF-I en las líneas celulares de adipocitos marrones

de dos rutas principales: la MEK/MAP-quinasa y la PI 3-quinasa/Akt, siendo capaces de regular a través de estas rutas los niveles de la proteína Bcl-x<sub>S</sub> (Figura 5).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) KERR JFR, WINTERFORD CM AND HARMON BV (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8) 2013-2026.
- (2) FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL AND HENSON PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- (3) WYLLIE H (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- (4) COHEN GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16.
- (5) VILLA P, KAUFMANN SH AND EARNSHAW WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22, 388-393.
- (6) DOLLE RE, SINGH J, RINKER J, HOYER D, PRASAD CV, GRAYBILL TL, SALVINO JM, HELASZEK CT, MILLER RE AND ATOR MA (1994) Aspartyl alpha-((1-phenyl-3-(trifluoromethyl)-pyrazol-5-yl)oxy)me-thyl ketones as interleukin-1 beta converting enzyme inhibitors. Significance of the P1 and P3 amino nitogens for enzyme-peptide inhibitor binding. *J Med Chem* 37, 3863-3866.
- (7) BOISE LH, GONZALEZ-GARCÍA M, POSTEMA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUÑEZ G AND THOMPSON GB (1993) *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- (8) DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y AND GREENBERG ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- (9) DEL PESO L, GONZÁLEZ-GARCÍA M, PAGE C, HERRERA R AND NUÑEZ G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- (10) PARRIZAS M, BLAKESLEY VA, BEITNER-JOHNSON D AND LE ROITH D (1997) The proto-oncogene Crk-II enhances apoptosis by a Ras-dependent, Raf-1/MAP kinase-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 616-620.
- (11) BENITO M, PORRAS A AND SANTOS E (1993) Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T Antigen and ras genes. *Exp Cell Res* 209, 248-254.
- (12) LORENZO M, VALVERDE AM, TERUEL T, ALVAREZ A AND BENITO M (1996) p21-ras induced differentiation-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cells and cell lines. *Cell Growth Differ* 7, 1251-1259.
- (13) VALVERDE AM, LORENZO M, NAVARRO P AND BENITO M (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 11:595-607,
- (14) VALVERDE AM, LORENZO M, PONS S, WHITE M AND BENITO M (1998) IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/IGF-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12, 688-697.

- (15) TERUEL T, VALVERDE AM, BENITO M AND LORENZO M (1996) Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in foetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* 319, 627-32.
- (16) PORRAS A, ALVAREZ AM, VALLADARES A AND BENITO M (1997) TNF- $\alpha$  induces apoptosis in rat fetal brown adipocytes in primary culture. *FEBS Lett* 416, 324-328.
- (17) HAVIV R, LINDENBOIM L, YUAN J AND STEIN R (1997) Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res* 50, 69-80.
- (18) HAVIV R, LINDENBOIM L, YUAN J AND STEIN R (1998) Need for caspase-2 in apoptosis of growth-factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res* 52, 491-497.
- (19) XUE D AND HORVITZ HR (1997) *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 390, 305-308.
- (20) CHENG EH-Y, KIRSCH DG, CLEM RJ, RAVI R, KASTAN MB, BEDI A, UENO K AND HARDWICK JM (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.
- (21) ALESSI DR, CUENDA A, COHEN P, DUDLEY DT AND SALTIEL AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489-27494.
- (22) WANG HG, MILLAN JA, COX AD, DER CJ, RAPP VR, BECK T, ZHA H AND REED JC (1995) R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a Bcl-2 suppressible mechanism. *J Cell Biol* 129, 1103-1114.
- (23) CHEN CY AND FALLER DV (1996) Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21<sup>ras</sup> in Ras-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 2376-2379.
- (24) PARRIZAS M AND LEROITH D (1997) Insulin-like Growth Factor-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-x<sub>L</sub> gene product. *Endocrinology* 138, 1355-1358.
- (25) VALVERDE AM, LORENZO M, TERUEL T AND BENITO M (1997) Alterations in the insulin signaling pathways induced by immortalization and H-ras transformation of brown adipocytes. *Endocrinology* 138, 3195-3206.
- (26) OKADA T, SAKUMA L, FUKUI Y, HAZEKI O AND UI M (1994) Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 269, 3563-3567.
- (27) VLAHOS CJ, MATTER WF, HUI KY AND BROWN RF (1994) An specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.
- (28) NISOLI E, BRISCINI L, TONELLO C, DE GIULI-MORGHEN C AND CARRUBA MO (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis in rat brown adipocytes. *Cell Death Differ* 4, 771-778.
- (29) EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, LITTLEWOOD TD, LAUD H, BROOKS M, WATERS CM, PENN LZ AND HANCOCK DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblast by c-Myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- (30) RAFF MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

- (31) FERRARI G AND GREENE L (1994) Proliferative inhibition by dominant-negative Ras rescues naive and neuronally differentiated PC12 cells from apoptotic death. *EMBO J* 13, 5922-5928.
- (32) YAO R AND COOPER GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- (33) MCCARTHY NJ, WHYTE MKB, GILBERT CS AND EVAN GI (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215-227.
- (34) YAMAMOTO AM, ELOY L, BACH JF AND GARCHON HJ (1998) N-terminus cleavage of bcl-2 by a novel cellular non-ICE cysteine proteinase. *Leukemia* 12, 1467-1472.
- (35) GREEN DR AND REED JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- (36) GREEN D AND KROEMER G (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8, 267-271.
- (37) KAUFFMANN-ZEH A, RODRIGUEZ-VICIANA P, ULRICH E, GILBERT C, COFFER P, DOWNWARD J AND EVAN G (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-548.
- (38) LIU HS, CHEN CY, LEE CH AND CHOU YI (1998) Selective activation of oncogenic Ha-ras-induced apoptosis in NIH/3T3 cells. *Br J Cancer* 11, 1777-1786.
- (39) FERNANDEZ-SARABIA MJ AND BISCHOFF JR (1993) Bcl-2 associates with the ras-related protein R-Ras p23. *Nature* 366, 274-275.
- (40) PARRIZAS M, SALTIEL AR AND LEROITH (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and Mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272, 154-161.
- (41) HARRINGTON EA, BENNETT MR, FANIDI A AND EVAN GI (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 13, 3286-3295.
- (42) FABREGAT I, SÁNCHEZ A, ALVAREZ AM, NAKAMURA T AND BENITO M (1996) Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Letters* 384, 14-18.
- (43) VALVERDE AM, TERUEL T, LORENZO M AND BENITO M (1996) Involvement of Raf-1 kinase and protein kinase C  $\zeta$  in Insulin-like growth factor I-induced brown adipocyte mitogenic signaling cascades: inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 137, 3832-3841.
- (44) DUDEK H, DATTA SR, FRANKE TF, BIRNBAUM MJ, YAO R, COOPER GM, SEGAL RA, KAPLAN DR AND GREENBERG ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-664.
- (45) KULIK G, KLIPPEL A AND WEBER MJ (1997) Antiapoptotic signalling by the Insulin-like Growth Factor I Receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17, 1595-1606.

- (46) FRANKE TF, KAPLAN DR AND CANTLEY LC (1997) PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437.
- (47) BURGERING BMTH AND COFFER PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
- (48) ANDJELKOVIC M, ALESSI DR, MEIER R, FERNANDEZ A, LAMB NJC, FRECH M, CRON P, LUCOCQ JM AND HEMMINGS BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 31515-31524.
- (49) SOMWAR R, SUMITANI S, TAHA C, SWEENEY G AND KLIP A (1998) Temporal activation of p70 S6 kinase and akt1 by insulin: PI 3-kinase-dependent and -independent mechanism. *Am J Physiol* 275, 618-625.

**PIES DE FIGURAS**

**Figura 1.- Análisis por citometría de flujo de adipocitos marrones teñidos con yoduro de propidio:** Tras crecer las células en medio suplementado con 10% SF, se les retiró el suero durante 6 ó 12h. Pasado este tiempo, se recogieron las células, y se procesaron para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo.  $M_1$  representa el porcentaje de células con un contenido en ADN inferior a 2C. Los resultados son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos distintos.

**Figura 2.- Fragmentación del ADN de adipocitos marrones inmortalizados en ausencia de suero:** Los adipocitos marrones inmortalizados crecieron en presencia de suero, y posteriormente se cultivaron en ausencia del mismo durante distintos tiempos. A continuación se realizó la extracción del ADN extranuclear y se procedió a su análisis electroforético en gel de agarosa. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. En el último carril se muestra un marcador de peso molecular (M) (escalera de ADN de 100 pb).

**Figura 3.- Niveles de proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2:** Los histogramas representan los niveles de las proteínas Bcl-x<sub>S</sub> y Bcl-2 en unidades arbitrarias, y son medias  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos independientes.

**Figura 4.- Representación del modelo de apoptosis inducido por la ausencia de suero en las líneas celulares de adipocitos marrones**

**Figura 5.- Modelo de supervivencia inducido por insulina/IGF-I en las líneas celulares de adipocitos marrones**

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

\_\_\_\_\_ Artículos \_\_\_\_\_  
Originales

**Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs) y sus  
Aplicaciones en la Construcción de Inmunotoxinas  
para la Terapia Experimental del Cáncer\***

TOMÁS GIRBÉS JUAN

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Facultad  
de Ciencias, Universidad de Valladolid, 47005 Valladolid.*

RESUMEN

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) son inhibidores de la síntesis de proteínas que inactivan a los ribosomas de manera irreversible. Las más conocidas son las RIPs vegetales de las cuales ricina es la más estudiada. El mecanismo de acción consiste en la depuración del ARNr mayor de los ribosomas (28 S ARNr en el caso de los mamíferos). Las RIPs aceptan también otros sustratos tales como ADN, ARN genómico viral y algunos polinucleótidos sintéticos que resultan multidepurados. Diversas RIPs presentan actividad antiviral contra virus vegetales y animales y actividad topológica sobre el ADN. En nuestro laboratorio hemos descubierto un nuevo tipo de RIP que hemos denominado RIP de tipo 2 no tóxica. Entre estas RIPs cabe destacar nigrina b y nigrina b básica de *Sambucus nigra* y ebulina de *Sambucus ebulus*. Estas RIPs son entre 1.000 y 10.000 veces menos tóxicas para células cultivadas y ratones que la ricina. La aplicación más notable de las RIPs es la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia experimental en particular la del cáncer humano. En nuestro laboratorio hemos preparado conjugados activos contra las células de cáncer de colon e inmunotoxinas activas contra células CD105+ características de la neovasculatura tumoral.

---

\* Discurso leído en su Toma de Posesión como Académico Correspondiente el 25 de noviembre de 1999.

**Palabras clave:** Proteínas inactivadoras de ribosomas.- RIPs.- Síntesis de proteínas.- Inmunotoxinas.- Cáncer.

#### SUMMARY

##### **Ribosome-Inactivating proteins (RIPs) and their application in the construction of immunotoxins for the experimental therapy of cancer.**

The ribosome –inactivating proteins (RIPs) are protein synthesis inhibitors that trigger the irreversible inactivation of ribosomes. The most known RIPs are those from plants being ricin the most studied one. The molecular mechanism of action of RIPs is the depurination of the largest rRNA (28 S rRNA in mammalian). RIPs act also on other substrates like DNA, viral genomic RNA and some synthetic polynucleotides which become multidepurinated. Some RIPs display antiviral activity on plant and animal viruses and also have a topological activity on double stranded DNA. We have found a novel kind of RIP that we named non-toxic type 2 RIP. Among these RIPs are nigrin and basic nigrin b from *Sambucus nigra* and ebulin from *Sambucus ebulus*. The new RIPs are between 1.000 and 10.000 times less toxic for cultured human cells and mice than ricin. The most noteworthy application of RIPs is the construction of conjugates and immunotoxins for the experimental therapy of human cancer. We have prepared conjugates active on colon cancer cells and immunotoxins active on CD105+ cells which are characteristic of the tumoral neovasculature.

**Key words:** Ribosome-inactivating proteins.- RIPs.- Protein synthesis.- Immunotoxins.- Cancer.

Excmo. Sr. Director de la Real Academia de Farmacia, Excmas. Sras. Académicas, Excmos. Sres. Académicos, señoras y señores, es para mi un gran honor ser admitido en la Real Academia de Farmacia y poder dirigirme hoy a todos ustedes. Quiero agradecer en primer lugar al Profesor D. Manuel Ruiz Amil Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y amigo, el haberme propuesto a esta institución como académico correspondiente y en segundo lugar el haber presentado mi curriculum de la manera tan generosa con que lo ha hecho. Agradezco asimismo a los Profs. D. Antonio Portolés Alonso y D. Juan Tamargo Menéndez el haber apoyado la propuesta del Prof. Ruiz Amil. Tengan la seguridad de que haré lo posible para no defraudarles y espero ser digno del honor que se me hace.

No estaría quizás hoy aquí si el malogrado Dr. David Vázquez no me hubiese orientado hace ya 25 años hacia el estudio de la biosíntesis de proteínas, tema este sobre el que continúo estudiando. Por lo tanto agradezco también al Dr. David Vázquez, cuya talla científica no voy a descubrir hoy aquí, la oportunidad única e inestimable que me brindó hace ya tanto tiempo. Agradezco también al Dr. D. Juan Modolell Mainóu su dirección en mi etapa formativa y su rigor científico que me han influido positivamente durante todos estos años. Mi agradecimiento se extiende también al Prof. D. Roberto Parrilla Sánchez, con cuyo trato adquirí una visión de conjunto de los procesos fisiológicos, que me ha ayudado a comprender gran cantidad de fenómenos de los seres vivos. Durante los años de mi carrera académica he contado con la inestimable ayuda de colegas y amigos sin cuyo trato enriquecedor muchas veces hubiese renunciado a la dura labor que supone la dedicación a la docencia y a la investigación, como todos ustedes saben bien, y en particular en las Universidades de provincias.

Mi actividad investigadora ha versado sobre diversos temas más o menos relacionados con la biosíntesis de proteínas. Hoy quiero presentarles de manera forzosamente sucinta la actividad que me ha ocupado los últimos 10 años, esto es, la investigación sobre las proteínas inactivadoras de ribosomas de origen vegetal, proteínas que como veremos están influyendo de modo decisivo en la terapia experimental de diversas enfermedades en particular del cáncer.

En 1978 el defensor de los derechos humanos Georgi Markov fue asesinado en las calles de Londres mediante un pinchazo en la pierna con la punta de un paraguas. Markov murió a los pocos días entre agudos dolores sin que se pudiese hacer nada por salvar su vida (1). Una profunda investigación reveló que la punta del paraguas contenía una minúscula cantidad de ricina, una poderosa toxina proteica aislada de las semillas del ricino (*Ricinus communis*) por Stillmark en 1889 (2). Pero no fue hasta la década de los setenta de nuestro siglo, exactamente en 1975, en el laboratorio del Dr. David Vázquez, cuando se descubrió que su acción sobre la biosíntesis de proteínas se ejercía de manera catalítica e irreversible (3). La ricina es hoy en día cabeza de serie de una familia de proteínas que comparten con la ricina el mismo efecto sobre la síntesis de

proteínas, esto es la inactivación irreversible de los ribosomas, de ahí que se conozcan como proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs, del inglés ribosome-inactivating proteins. Ruego me disculpen que por comodidad y fluidez expositiva utilice este término de RIP. Este campo puede considerarse en parte como desarrollo de la actividad pionera del Dr. David Vázquez y sus colaboradores sobre el modo de acción de los antibióticos y otros inhibidores de la síntesis protéica (4).

He dividido la exposición que voy a realizar en dos partes, en la primera dedicada a las RIPs abordaré los aspectos más notables de las RIPs de origen vegetal como son su distribución y clasificación, su estructura, su modo de acción molecular y celular, sus efectos antivirales y su posible papel biológico, y terminaré esta primera parte con las RIPs del género *Sambucus*.

En la segunda parte abordaré las aplicaciones de las RIPs a la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia experimental del cáncer, la angiogénesis asociada a tumores, la inmunotoxiterapia contra la neovascularización tumoral y terminaré con la consideración de algunos problemas clínicos que plantea la utilización in vivo de las inmunotoxinas en la terapia experimental del cáncer.

Veamos en primer lugar la distribución y clasificación de las RIPs vegetales. Hasta la fecha se han aislado 79 RIPs de origen vegetal, de las cuales, aproximadamente un tercio han sido descubiertas en nuestro laboratorio o en colaboración con investigadores extranjeros. Las familias Caryophyllaceae, Phytolacaceae, Euphorbiaceae, Cucurbitaceae y especialmente Sambucaceae son las más estudiadas y en las que se han encontrado mayor número de especies con RIPs. Entre estas RIPs cabe destacar además de la ricina, las saporinas, las PAP, la tricosantina o sustancia GLQ223, nigrina y ebulina por sus aplicaciones en la terapia humana como veremos después (4-6).

En la actualidad se clasifica a las RIPs esencialmente en dos categorías: RIPs de tipo 1 y RIPs de tipo 2 (4-6). Las RIPs de tipo 1 están formadas por una sola cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad inhibidora de síntesis de proteínas. Las RIPs de tipo 2 están formadas por dos cadenas polipeptídicas heterólogas, una cadena inhibidora de síntesis de proteínas equivalente a las RIPs de tipo 1 que se

denomina cadena A y una cadena con propiedades de lectina, esto es proteína que liga azúcares, que se denomina cadena B. Las RIPS de tipo 2 pueden ser tóxicas como la ricina, abrina y proteínas relacionadas (5,6), debido a que poseen un dominio protéico que les permite atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol donde inhiben la síntesis de las proteínas. Las RIPS de tipo 2 pueden ser también no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones en relación con la ricina. Solo a concentraciones de entre 1.000 y 10.000 veces superiores a la ricina presentan toxicidad en ratones. Las RIPS de tipo 1 son menos tóxicas para las mismas células y animales de ensayo que las de tipo 2 tóxicas, excepción hecha de los macrófagos (5,6).

Las RIPS no tóxicas de dos cadenas han sido descubiertas en nuestro laboratorio (5-9). Como veremos después estas RIPS no tóxicas pueden ser de una gran utilidad potencial para la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia humana.

Veamos ahora la estructura de las RIPS. Las RIPS monocatenarias o de tipo 1 son polipéptidos de masa relativa entre 25.000 y 32.000. Todas las RIPS de tipo 1 conocidas poseen un carácter fuertemente básico con puntos isoeléctricos en el entorno de 9. Ello indica la predominancia de aminoácidos básicos; de hecho, el análisis del contenido en aminoácidos así lo indica. Muchas de ellas están glicosiladas lo que les confiere un fuerte carácter antigénico (5,6).

Las RIPS bicatenarias o de tipo 2 poseen masas relativas entre 56.000 y 68.000 con subunidades de masas relativas entre 26.000 y 33.000 (cadena A) y 28.000 y 38.000 (cadena B). En muchos casos están también glicosiladas. Las cadenas A de las RIPS de tipo 2 poseen homología secuencial con las RIPS monocatenarias, mientras que las cadenas B la poseen con las lectinas de la misma familia vegetal (5,6).

Los estudios de estructura por difracción de rayos X han permitido revelar la estructura espacial fina de algunas de estas proteínas. El ejemplo más notable es la ricina, en cuya estructura se han podido definir los sitios de unión de la cadena B con restos de galactosa, las cadenas de polisacárido unidas covalentemente en la cadena B y el centro

activo responsable de la actividad enzimática localizado en la cadena A (5).

Veamos ahora el modo de acción molecular de las RIPs. A finales de 1987 Endo descubrió que la ricina presentaba una actividad enzimática como N-glicosidasa del ácido ribonucleico ribosómico o ARN 28 S. Posteriormente se ha demostrado esta actividad como característica de las RIPs. La actuación enzimática de las RIPs tanto de una como de dos cadenas provoca la hidrólisis del enlace N-glucosídico entre la adenina y la ribosa del nucleósido A-4324 del 28 S ácido ribonucleico de los ribosomas de mamífero. El resultado de esta acción enzimática es que el ribosoma apurínico resultante es inactivo en síntesis de proteínas (10).

La adenina liberada se encuentra localizada en un bucle del ARN ribosómico altamente conservado que se presenta en ribosomas de mamíferos, hongos, plantas y bacterias (6), y que participa en la interacción con el ribosoma del factor de elongación 2 que es responsable de la translocación en organismos superiores y del factor de elongación G responsable de la translocación en bacterias. Precisamente, mis primeros trabajos de investigación realizados con el Dr. Juan Modolell en el laboratorio del Dr. David Vázquez hace más de 20 años, demostraron que la energía liberada en la hidrólisis de GTP en esta interacción se utiliza en favorecer la liberación rápida del factor de elongación de la superficie ribosómica una vez concluida la etapa de elongación (11-13).

Los análisis estructurales realizados en los últimos años indican que varias RIPs poseen homología secuencial de amino ácidos con el enzima topoisomerasa II del ADN de *Drosophila* (14). El estudio posterior indicó que dichas RIPs presentan actividad topológica sobre el ADN, lo que provoca cambios en la estructura del ADN superenrollado pero no en el ADN lineal. Primero provoca la relajación de la forma superenrollada y después provoca cortes en las dos cadenas de ADN lo que conlleva la aparición de la forma lineal. Se ha sugerido que esta actividad enzimática de las RIPs podría ser la base, o al menos una de ellas, de los efectos anti-VIH-1 de las RIPs (15).

En los últimos años se ha podido comprobar que la actividad N-glicosidasa característica de las RIPs puede ejercerse también sobre el ADN y el ARN ribonucleico no ribosómico. Así Stirpe y cols. han

descrito que varias RIPS descubiertas en colaboración con nuestro laboratorio, en particular las saporinas presentes en *Saponaria officinalis* (16), pueden depurar polinucleótidos sintéticos, ácido ribonucleico genómico viral y ácido desoxirribonucleico de esperma de salmón (17).

Esto nos introduce en el apartado sobre los efectos antivirales de las RIPS. Las RIPS poseen propiedades antivirales tanto sobre virus vegetales como animales. Abrina, diantinas, PAP, ricina y saporinas ejercen efectos inhibidores claros sobre los virus TMV y PVX. De hecho una RIP clásica como la PAP se describió primero como proteína antiviral (pokeweed antiviral protein) (18). Las RIPS poseen efectos inhibidores también contra los virus animales por ejemplo, PAP, tricosantina, gelonina y diantinas inhiben a los virus del SIDA y del herpes simplex en experimentos con células aisladas (5,6).

Recientemente hemos descrito que la infección de hojas de remolacha (*Beta vulgaris*) con virus vegetales induce la expresión de dos RIPS monocatenarias relacionadas entre sí a las que hemos denominado beetinas 27 y 29 (19). Nosotros hemos conseguido el mismo efecto de inducción de ambas beetinas por los virus vegetales, en plantas control crecidas en el laboratorio bajo condiciones controladas, mediante la administración de mediadores químicos de la acción molecular del virus a nivel intracelular como son el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno (19).

La elevación de la concentración intracelular de ambas sustancias promueve la denominada respuesta sistémica adquirida en la que cabe destacar la síntesis de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR proteins) muchas de ellas quitinasas y glucanasas que son activas frente a los hongos fitopatogénicos y determinadas proteínas de carácter antiviral entre ellas las beetinas. Resultados recientes (pendientes de publicación) indican que la inducción de las beetinas en plantas en condiciones controladas previene de la infección viral. Esto apoya la hipótesis de que el papel biológico de estas RIPS podría estar relacionado con la defensa de la planta frente a la agresión de determinados virus vegetales.

A pesar del enorme interés de estos efectos de las RIPS, no se conoce aún el mecanismo molecular mediante el cual las RIPS ejercen su

efecto antiviral. Se ha descrito un efecto inhibitor sobre los ribosomas de las células infectadas por virus lo que provocaría una especie de suicidio de las células infectadas, un efecto depurinante e inactivador directo sobre virus, un efecto inhibitor independiente de la actividad N-glicosidasa, una actividad topoisomerasa o como en el caso del virus del SIDA, una inhibición de la actividad integrasa del virus como ha sido demostrado recientemente por el grupo de la Prof. S. Lee-Huang (15).

En relación con el posible papel desempeñado por las RIPs en la defensa de las plantas frente a las infecciones fúngicas y víricas, quiero destacar que investigaciones recientes de nuestro grupo en colaboración con el de la Prof. Karen MacDonald de la Universidad de Davis, California, han permitido descubrir tres quitinasas monocatenarias de *T. kirilowii* con actividad RIP (20) y con homología secuencial con la tricosantina, una RIP que posee actividad antiviral in vivo contra el virus del SIDA (5,6). En el caso de estas tres proteínas podríamos estar ante unos agentes polivalentes de defensa antifúngica y antiviral.

Respecto al modo de acción celular de las RIPs, mientras que las RIPs de tipo 1 o de una cadena son muy poco tóxicas para las células cultivadas y para los animales de experimentación, ya que no pueden entrar en el citoplasma por si mismas, las RIPs de tipo 2 como ricina, abrina, volkensina, modecina y viscumina son extremadamente tóxicas para las células intactas debido a la presencia de la cadena B translocadora que es capaz de fijarse a receptores de membrana plasmática y promover la internalización del complejo toxina-receptor. Posteriormente la ricina es transportada al aparato de Golgi y de allí es transferida al retículo endoplásmico rugoso en donde se disocia permitiendo la entrada en el citosol de la cadena A, que como hemos comentado es la especie enzimáticamente activa y allí inactiva a los ribosomas (5,6).

Este tipo de transporte se conoce como transporte retrógrado porque va desde los endosomas hasta el retículo endoplásmico rugoso, vía esta contraria a la vía normal de secreción de proteínas, y por ello el nombre de transporte retrógrado.

Una de las familias más notables en lo que a RIPs se refiere es la Sambucaceae. En 1992 descubrimos en mi laboratorio un grupo de

RIPs de dos cadenas del tipo de la ricina que poseen la notable propiedad de tener una actividad tóxica sobre células humanas cultivadas así como sobre ratones de unas 1.000 a 10.000 veces menor que la ricina, abrina y las otras RIPs altamente tóxicas (6).

De la corteza de *Sambucus nigra* hemos aislado dos RIPs de tipo 2, nigrina b de estructura AB y masa relativa 58.000 (9) y nigrina b básica de estructura AB y masa relativa 64.000 (21). La corteza contiene además otra RIP muy poco activa denominada SNA I descubierta en 1984 por Brokaert y cols (6).

De las hojas hemos aislado también una RIP denominada nigrina l de estructura AB y masa relativa 63.000 (pendiente de publicación). Los frutos de *Sambucus nigra* contienen también una RIP equivalente a nigrina b denominada nigrina f (22) y lo que es muy notable, RIPs de tipo I monocatenarias que hemos denominado nigrinas de masa relativa 24.000 (23). Las nigrinas ácidas de *Sambucus* fijan polisacáridos con galactosa terminal lo que facilita su aislamiento por cromatografía de afinidad. Así la corteza de *Sambucus nigra* posee proteínas que se fijan a una matriz cromatográfica que contiene restos de galactosa, y por lo tanto pueden ser eluidas de la columna por la adición de galactosa. Estas proteínas pueden ser separadas por cromatografía de exclusión molecular lo que permite detectar la nigrina b. Fue el desarrollo de esta técnica lo que nos permitió descubrir esta notable proteína que había pasado desapercibida anteriormente (9). El análisis electroforético de estos tres picos proteicos nos permite apreciar que se trata de proteínas homogéneas de masas relativas 140, 58 y 30. SNA I y nigrina son RIPs, SNA II es una lectina monomérica (9).

Cuando investigamos la actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas de la nigrina b utilizando sistemas acelulares tales como los extractos de lisados de reticulocito de conejo, de hígado y de cerebro de rata, encontramos que la concentración de proteína que inhibe un 50 % es de 10 ng/ml, esto es de rango subnanomolar, y por lo tanto ligeramente más activa que la ricina en los mismos sistemas. En contraste nigrina b no afecta a los ribosomas de plantas tales como trigo, *Vicia sativa* y *Cucumis sativus* (9).

La sorpresa vino cuando estudiamos la síntesis de proteínas en células humanas cultivadas, pues mientras que la ricina inhibe a 1 ng/ml, la nigrina no hace absolutamente nada a esta concentración. Es más, mientras que la dosis letal 50 % in vivo de la ricina es de 2,6 microgramos/Kg, la de la nigrina es 12 mg/kg en ratones (9).

Respecto al mecanismo molecular de inhibición de la nigrina b es el mismo que el de la ricina, esto es la inactivación por depuración del ARN ribosómico que después de su tratamiento con anilina en medio ácido libera un fragmento de ARN que se denomina fragmento de Endo y que es diagnóstico de la acción de las RIPs (9).

El ARN ribosómico no es el único sustrato de las RIPs. Utilizando las nigrinas b y b básica hemos podido observar que ambas RIPs pueden atacar tanto a ribosomas de reticulocito de conejo, generando los fragmentos de Endo con anilina ácida, como al ARN genómico del virus del mosaico del tabaco, que al tratarse con anilina ácida se degrada totalmente, lo que es síntoma de una multidepuración extensa. Una de las nigrinas, la nigrina b básica, posee actividad topológica sobre el ADN promoviendo la transición del ADN superenrollado a las formas relajada y lineal (9,21).

*Sambucus ebulus* es una especie muy parecida a *Sambucus nigra* de la que hemos aislado también diversas RIPs tanto de hojas, de frutos como de rizomas. La proteína más estudiada ha sido la ebulina (8), un dímero AB de masa relativa 56.000 cuya estructura molecular ha sido determinada conjugando la secuencia del gen que la codifica con los estudios de difracción de rayos X, trabajo este que se está realizando en colaboración con el Prof. Jon Robertus de la Universidad de Texas en Austin (pendiente de publicación). Como podemos ver la estructura de la ebulina, aunque es distinta, se parece bastante a la de la ricina.

Para elucidar la causa de la falta de toxicidad de la nigrina en relación con la ricina, iniciamos unos estudios de toxicidad comparada en colaboración con el Prof. Fiorenzo Stirpe de la Universidad de Bolonia y pudimos determinar que prácticamente toda la nigrina b que se une a receptores de la membrana plasmática entra en la célula, es degradada y sus restos expelidos después al espacio extracelular. Únicamente a muy altas concentraciones, algunas moléculas presentes en los endosomas

translocan espontáneamente al citosol y pueden entonces inhibir la síntesis de proteínas (24).

Dado que, como también hemos demostrado recientemente la mayor parte de ricina captada por la célula es degradada como la nigrina, y que una pequeña fracción de ricina sufre transporte retrógrado responsable de la alta toxicidad como ya hemos comentado (24), proponemos la existencia de al menos dos tipos de receptores de membrana plasmática para la ricina. Uno sería el responsable del transporte mayoritario e improductivo, como le sucede a la nigrina b, mientras que el otro sería responsable de que una pequeña parte de ricina se internalice por la vía de transporte retrógrado al aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplásmico rugoso, y de allí al citosol en donde provocaría la inhibición de la síntesis de proteínas. La existencia de ambos tipos de receptores para la ricina está en estudio en mi laboratorio en la actualidad.

En la segunda parte de esta exposición quiero abordar la utilización de RIPS en la construcción de inmunotoxinas y conjugados de utilidad en la terapia experimental del cáncer.

Una inmunotoxina es una especie molecular producida artificialmente a partir de un anticuerpo y una toxina, en particular una proteína inactivadora de ribosomas. El anticuerpo está dirigido contra un antígeno presente en la superficie de la célula blanco y por ello las inmunotoxinas se convierten en los “proyectiles mágicos de Ehrlich”, al identificar y matar a dichas células blanco (5,6,25).

Las primeras inmunotoxinas construidas utilizaban como toxina la ricina entera, pero la elevada toxicidad inespecífica de esta poderosa toxina desaconsejó su uso en terapia. El establecimiento de las inmunotoxinas como herramientas terapéuticas vino con las denominadas inmunotoxinas de primera generación, consistentes en la cadena A de la ricina procedente de la disociación de ricina en medio reductor unida por puentes disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido a la célula blanco. Sin embargo, la presencia de pequeñísimas cantidades de cadena B contaminante permitía la reconstitución de la molécula de ricina y confería a las preparaciones de inmunotoxina una toxicidad inespecífica intolerable para una terapia eficaz y segura (5,6).

Una solución vino con la utilización de RIPs monocatenarias, por ejemplo del tipo de las saporinas y con la generación de cadena A de ricina por ingeniería genética. Sin embargo las inmunotoxinas formadas con RIPs de tipo 1 son inestables y a menudo resultan muy tóxicas, como en el caso de las inmunotoxinas construidas con saporina.

Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas que presenten moléculas distintivas específicas en su superficie celular y que estén ausentes o a menor concentración en la superficie celular de las células sanas. En la bibliografía actual se describen tratamientos con inmunotoxinas construidas con RIPs de tipo 1 como saporina contra la enfermedad de Hodgking, momordina contra el mieloma múltiple y PAP contra el SIDA. Sin embargo la RIP más utilizada ha sido y es la cadena A de la ricina contra el SIDA, los cánceres de colon y de mama, en la enfermedad de rechazo del injerto frente al huésped, en la leucemia linfoblástica y en la vitreorretinopatía proliferante, por citar algunos ejemplos notables (5).

En el caso del SIDA, las inmunotoxinas formadas con RIP de tipo 1 y anticuerpos monoclonales anti-gp120 o anti-gp41 se añaden al posible valor terapéutico que poseen las RIPs aisladas. Ello abre unas perspectivas excelentes para la terapia experimental del SIDA habida cuenta del fracaso que se ha empezado a apreciar en las terapias con agentes antiretrovirales. Se sabe ya que la aparición de resistencia in vivo contra uno de los inhibidores de la proteasa provoca resistencia cruzada a otros fármacos inhibidores también de la proteasa. Además, datos recientes indican que la supresión de la terapia permite la reaparición del virus procedente de santuarios celulares que no bien conocidos en la actualidad. En estos casos, quizás una terapia con inmunotoxinas dirigidas a estas células podría eliminar definitivamente el reservorio y por tanto la infección latente.

Las inmunotoxinas de segunda generación utilizan ricina intacta. Se trata con este enfoque de eliminar por vía química la toxicidad inespecífica de la ricina debida a la presencia de los sitios de unión a receptores potenciales de traslocación, que como recordaremos son los responsables del transporte anterógrado causante de la translocación en el

retículo endoplasmático de la cadena A y por lo tanto responsables de la extraordinaria toxicidad de la ricina (26).

Para ello se procede a fijar una cadena de polisacárido activada químicamente a la ricina. La reacción covalente de este polisacárido con los sitios de fijación de azúcar de la ricina produce una especie de ricina que se denomina ricina bloqueada que presenta mucho menos toxicidad inespecífica que la ricina nativa. Sin embargo este tratamiento conlleva una notable pérdida de actividad enzimática de la ricina concomitante con la manipulación química de la toxina y de los procesos de purificación ulteriores. A pesar de ello, una de estas inmunotoxinas con ricina bloqueada se encuentra ya en el mercado con el nombre de oncolisina y ha demostrado una notable efectividad en ciertos tipos de linfoma.

La mayor parte de las inmunotoxinas utilizadas hasta el momento han sido construidas contra las células enfermas y en el caso del cáncer contra las células tumorales. El interior de un tumor de cierto tamaño posee presión positiva respecto al entorno lo que dificulta notablemente la accesibilidad de las células tumorales a los agentes anticancerosos. Ello obliga a utilizar concentraciones elevadas de fármaco para alcanzar concentraciones intratumorales de fármaco efectivas.

Por todo ello, en los últimos años se ha desarrollado un concepto de lucha antitumoral experimental distinto, basado en el bloqueo de la vasculatura tumoral con agentes antiangiogénicos. La estrategia se basa en que cuando un tumor "in situ" crece a partir de cierto tamaño se produce un desarrollo de capilares para nutrir a la masa tumoral. Las propias células tumorales promueven el desarrollo de la red capilar a través de la estimulación del desarrollo de vasos capilares conocido como angiogénesis y del bloqueo de los inhibidores endógenos de angiogénesis. El resultado es que al aumentar la masa tumoral se desarrolla una red capilar denominada neovasculatura tumoral que nutre al tumor de manera independiente de la red vascular del tejido sano (27).

Pues bien la terapia antiangiogénica tiene como objetivo impedir que se desarrolle la neovasculatura tumoral para, de esta manera, eliminar el suministro de los nutrientes y el oxígeno que llegan al tumor a través de la neovasculatura tumoral y eliminar la masa tumoral sin

necesidad de atacar directamente a las células tumorales. Se ha determinado que la muerte de una célula endotelial de la neovasculatura induce la muerte de entre 100 y 250 células cancerosas.

Un nuevo enfoque que puede resultar complementario con la terapia antiangiogénica que hemos descrito consiste no en impedir que crezca la red capilar del tumor lo cual es un proceso lento, sino en destruir rápidamente la red ya formada en los tumores establecidos. Ello puede conseguirse con inmunotoxinas dirigidas específicamente contra la neovasculatura tumoral que destruyan dicha red vascular.

Nosotros hemos abordado este nuevo enfoque con las que denominamos inmunotoxinas de tercera generación. Estas inmunotoxinas están constituidas por nigrina o ebulina y un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína específica de la superficie celular de las células endoteliales de la neovasculatura tumoral o que esté presente en mayor concentración que en la vasculatura normal. Una molécula de estas características es la endoglina o CD105, proteína cuyas características moleculares y funcionales han sido estudiadas entre otros por el Dr. Carmelo Bernabéu, amigo y bioquímico que nos ayuda seleccionando y suministrándonos los anticuerpos monoclonales anti-endoglina para la construcción de estas inmunotoxinas. La endoglina se encuentra presente en la mayor parte de los tumores estudiados por técnicas morfológicas y aunque se encuentra presente en algún tejido, lo está a menor concentración (28).

Como la nigrina o la ebulina se une solo a los receptores responsables del reciclado y degradación concomitante al paso por los compartimentos lisosómicos, y no tiene el sitio para los receptores de translocación, no presenta la toxicidad inespecífica que presenta la ricina. La nigrina libre simplemente se degrada y no se internaliza en la célula vía transporte retrógrado como la ricina.

Las inmunotoxinas de nigrina son por lo tanto superiores a las construidas con ricina bloqueada porque, en primer lugar, la nigrina no se manipula químicamente y por ello no pierde ni actividad ni estabilidad y en segundo lugar al ser mucho menos tóxica que la ricina, la obtención y purificación de nigrina y su conjugación con los anticuerpos

monoclonales para la fabricación de las inmunotoxinas es mucho menos peligrosa que operando con la ricina.

Para investigar la citotoxicidad de una inmunotoxina construida con ebulina y un anticuerpo monoclonal anti-endoglina, el anticuerpo 44G4, hemos utilizado como células blanco mioblastos de rata transfectados con el gen de la endoglina humana en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu. Estas células expresan endoglina humana y por lo tanto pueden ser sensibles a nuestra inmunotoxina anti-endoglina.

Al estudiar la viabilidad celular frente a concentración de proteína, pudimos determinar que las células parentales que no expresan endoglina presentan la misma sensibilidad a la ebulina que a la inmunotoxina de ebulina. Por el contrario las células transfectadas con el gen de la endoglina humana son más sensibles a la inmunotoxina que a la ebulina. La ventana entre toxina e inmunotoxina es de más de dos órdenes de magnitud, pero como la muerte de una célula endotelial de la neovascularización tumoral acarrea la muerte de entre 100 y 250 células tumorales, la ventana real puede ser de entre 10.000 y 25.000 (29).

En cuanto al mecanismo de internalización de la inmunotoxina, aunque no está bien aclarado, creemos que la unión de la inmunotoxina a la endoglina provoca la internalización de todo el complejo y una vez en el citoplasma, el complejo podría seguir la vía de transporte retrógrado desde el endosoma hasta el retículo endoplásmico rugoso en donde se liberaría la cadena A de la ebulina al citosol e inhibiría la síntesis de proteínas al inactivar los ribosomas. Este mecanismo comportaría la detección de endoglina en vesículas de Golgi y en el retículo endoplásmico rugoso.

Alternativamente, el complejo endoglina-inmunotoxina podría simplemente provocar en el endosoma la translocación de la cadena A de la ebulina al citosol, y alcanzándose los ribosomas se bloquearía con ello la síntesis de proteínas. Ambas posibilidades abren una apasionante vía de investigación para elucidar las etapas participantes en el tráfico intracelular de esta inmunotoxina.

Las inmunotoxinas descritas hasta aquí están compuestas por una RIP y un anticuerpo monoclonal frente a una molécula presente de manera específica sólo o en mayor concentración en las células tumorales.

Este anticuerpo se puede sustituir por moléculas transportadoras diferentes permitiendo la construcción de conjugados también de gran utilidad para la terapia experimental.

Investigaciones recientes han demostrado que la metástasis del cáncer de colon cursa con la aparición de determinadas sialoproteínas en la superficie de las células malignas. Estas sialoproteínas contienen ácido siálico terminal ligado con enlace  $\alpha 2,6$  a Galactosa o NAc-Galactosamina. La RIP SNA I de corteza de *Sambucus nigra* a través de su cadena B, liga también ácido siálico mediante enlace  $\alpha 2,6$  a Galactosa o Nac-Galactosamina. Nosotros hemos aprovechado esta capacidad de SNA I para diseñar un conjugado con gran toxicidad específica para las células de cáncer de colon aisladas, que como hemos dicho presentan ácido siálico con enlace  $\alpha 2,6$  (30).

Este conjugado está constituido por nigrina o una RIP similar y la cadena B de la RIP SNA I unidas ambas proteínas por puentes disulfuro artificiales introducidos en ellas. La cadena B se manipula químicamente para impedir que se reasocie con las cadenas A de SNA I y en este proceso se pierde la capacidad de ligar galactosa pero se mantiene la de ligar ácido siálico.

Al estudiar la viabilidad celular de células Colo 320 procedentes de carcinoma de colon humano frente a la concentración de proteína, pudimos determinar que el conjugado es más tóxico que la RIP sola, con una ventana de entre 1,5 y 2 órdenes de magnitud como mínimo y con un mecanismo molecular de acción que suponemos muy similar al de la inmunotoxina antiangiogénica (31).

La Ciencia no está reñida con la belleza. Nosotros nos consideramos muy afortunados por haber podido traducir sólo en una minúscula parte la indudable belleza del saúco en términos moleculares. El descubrimiento de las RIPs del saúco nos ha permitido no sólo estudiar sus propiedades moleculares sino también utilizar estas proteínas, ebulina, nigrinas b y b básica y SNA I para la construcción de fármacos activos y muy específicos in vitro contra la vasculatura tumoral y las propias células cancerosas en el caso del cáncer de colon. La acción de ambos fármacos experimentales podría destruir tanto los tumores existentes, como las células malignas circulantes o los tumores avasculares y así

prevenir la metástasis. Los experimentos *in vivo* con animales dirán si estos conjugados e inmunotoxinas se comportan como se espera según los resultados *in vitro* y por lo tanto si son útiles o no.

Hasta ahora he mostrado la cara amable de las RIPs y de las inmunotoxinas y no quiero concluir esta exposición sin comentar algunos de los problemas clínicos que plantea el uso *in vivo* de inmunotoxinas y conjugados con RIPs.

Uno de los principales problemas en el tratamiento de tumores sólidos con inmunotoxinas y otros agentes químicos es que dichos agentes antitumorales entran con gran dificultad en el interior del tumor. Las células tumorales no están en contacto directo con la sangre, los agentes químicos tienen que penetrar en el interior del tumor. La presión en el interior del tumor es mayor que en el exterior y por lo tanto los fármacos solamente pueden entrar por difusión, para ello en muchos casos se deben utilizar concentraciones elevadas que son a menudo tóxicas para el paciente (32). Por ello teóricamente la terapia antiangiogénica parece ser superior a la terapia directa contra las células cancerosas.

Otro grave problema es la neutralización inmunológica de las inmunotoxinas. Las RIPs, como proteínas que son, desarrollan resistencia inmunológica al ser inyectadas en el organismo, por lo que la eficacia de una inmunotoxina viene dada no solo por su actividad específica sino también por la aparición de anticuerpos neutralizantes en el organismo receptor. En ensayos clínicos se ha puesto de manifiesto el problema de la aparición efectiva de anticuerpos neutralizantes tanto frente a la parte tóxica de la inmunotoxina como frente al anticuerpo monoclonal de ratón (33). Esto ha sido contrarrestado parcialmente administrando simultáneamente drogas citostáticas inmuno-depresoras (34). Una buena solución es la de disponer de una gran variedad de RIPs inmunológicamente distintas y que puedan conjugarse a distintos anticuerpos dirigidos frente al mismo blanco para aumentar así el arsenal de inmunotoxinas. Para reducir la respuesta contra el anticuerpo de ratón, la solución es humanizar el anticuerpo monoclonal de ratón por ingeniería genética.

Por último un serio problema que se ha observado en la terapia con inmunotoxinas es el denominado síndrome de pérdida o

derrame vascular (vascular leak syndrome). Este problema surge con la administración de inmunotoxinas de ricina fundamentalmente y consiste en la destrucción de capilares de manera aparentemente inespecífica, lo cual conlleva extravasación de sangre y formación de edema.

Recientemente, Siegall y cols. (35) han encontrado que la dexametasona previene dicho síndrome. Además la desoxiespergualina muestra una poderosa actividad inhibidora de este síndrome y suma además un efecto reductor de la respuesta inmunológica contra los anticuerpos de ratón, por lo que es concebible una notable mejora en los resultados de la terapia anticancerosa al reducir los efectos secundarios que son siempre limitantes (35).

El futuro de las RIPs y de las inmunotoxinas en la terapia experimental del cáncer es muy halagüeño habida cuenta de su efectividad y especificidad en los modelos experimentales, pero siempre que se resuelvan los problemas que ya hemos apuntado, como son fundamentalmente su carácter antigénico y el síndrome de derrame vascular que muchas de ellas presentan. Como también hemos apuntado hay soluciones factibles para ambos problemas. El hecho de que ya se haya constituido una compañía en EEUU con la finalidad de producir: inmunotoxinas, inmunoconjugados, fragmentos de anticuerpos monoclonales e inmunoenzimas, avala esta esperanza de futuro.

No quiero concluir esta exposición sin mostrar mi agradecimiento a mis colaboradores de los diez últimos años, algunos ya Profesores Titulares, otros postdoctorales y otros en fase de formación en mi laboratorio. A todos gracias. Tampoco puedo dejar de citar a investigadores como Stirpe, MacDonald, Lord, Méndez, Robertus, Shibuya, con los que hemos realizado investigaciones esenciales en los resultados que he presentado en esta exposición. A todos muchas gracias.

#### AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental presentado en este trabajo que ha sido realizado en mi laboratorio ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT GG85-0113), Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT BIO88-0705, CICYT

BIO92-0231, CICYT infra-BIO93-186, CICYT PTR94-0062, CICYT BIO95-0610, CICYT BIO98-0727), Consejería de Sanidad y Bienestar Social (convenios en los años 95 a 99), Iberduero y Fondos FEDER (1FD97-0110). Expreso mi agradecimiento a mis colaboradores españoles y extranjeros y a todas las instituciones que de alguna manera han posibilitado mi trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) CROMPTON, R. AND GALL, D. (1980) *Medico-legal J.* 48: 41-62.
- (2) STILLMARK, H. (1889) *Arb.pharmak.Inst.Dorpat* 3:59-151.
- (3) OLSNES, S., FERNANDEZ-PUENTES, C., CARRASCO, L. AND VÁZQUEZ, D. (1975) *Eur.J.Biochem.* 60: 281-288.
- (4) JIMÉNEZ, A. AND VÁZQUEZ, D. (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 649-672.
- (5) BARBIERI, L., BATTELLI, M.G. AND STIRPE, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237-282.
- (6) GIRBÉS T. Y FERRERAS, J.M. (1998) *Recent Res. Devel. in Agricultural and Biol. Chem.* 2: 1-16.
- (7) CITORES, L., FERRERAS, J.M., IGLESIAS, R., CARBAJALES, M.L., ARIAS, F.J., JIMÉNEZ, P., ROJO, M.A., GIRBÉS, T. (1993) *FEBS Lett.* 329: 59-62.
- (8) GIRBÉS, T., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., MUÑOZ, R., ROJO, M.A., ARIAS, F.J., GARCÍA, J.R., MÉNDEZ, E. AND CALONGE, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 18195-18199.
- (9) GIRBÉS, T., CITORES, L., FERRERAS, J.M., ROJO, M.A., IGLESIAS, I., MUÑOZ, R., ARIAS, F.J., CALONGE, M., GARCÍA, J.R. AND MÉNDEZ, E. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 1181-1186.
- (10) ENDO, Y. AND TSURUGI, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 8128-8130.
- (11) GIRBES, T., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67: 257-265
- (12) GIRBES, T., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 473-481
- (13) GIRBES, T., CAMPUZANO, S., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 483-490
- (14) LEE-HUANG S., KUNG, H.F., HUANG, P.L., HUANG, P.L., LI, B.Q., HUANG, P., HUANG, H.I. AND CHEN, H.C. (1991) *FEBS Lett.* 291: 139-144.
- (15) LEE-HUANG, S., KUNG, H. F., HUANG, P. L., BOURINBAIAR, A. S., HUANG, P. L., TSAI, W. P., CHEN, A. Y. AND HUANG, H. I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12208-12212.

- (16) FERRERAS, J.M., BARBIERI, L., GIRBÉS, T., BATTELLI, M.G., ROJO, M.A., ARIAS, F.J., ROCHER, A., SORIANO, F., MÉNDEZ, E. AND STIRPE, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 31-42.
- (17) BARBIERI, L., GORINI, P., VALBONESI, P., CASTIGLIONI, P. AND STIRPE, F. (1994) *Nature* 372: 624.
- (18) IRVIN, J.D. (1983) *Pharmac. Ther.* 21: 371-387.
- (19) GIRBÉS, T., DE TORRE, C., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M. AND MÉNDEZ, E. (1996) *Nature* 379: 777-778.
- (20) SHIH, N. R., MCDONALD, K. A., JACKMAN, A. P., GIRBÉS, T. AND IGLESIAS, R. (1997) *Plant Sci.* 130: 145-150
- (21) DE BENITO, F.M., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1997) *FEBS Lett.* 413: 85-91.
- (22) CITORES, L., DE BENITO, F.M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., JIMÉNEZ, P., ARGÜESO, P., FARIAS, G., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1996) *J. Exp. Bot.* 47: 1577-1585.
- (23) DE BENITO, F.M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., CITORES, L., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1998) *FEBS Lett.* 428: 75-79.
- (24) BATTELLI, M.G., CITORES, L., BUONAMICI, P., FERRERAS, J.M., DE BENITO, F.M., STIRPE, F. & GIRBÉS, T. (1997) *Arch. Toxicol.* 71: 360-364.
- (25) EHRLICH, P. (1956) in "Collected Papers of Paul Ehrlich" (Himmelweit, F. eds.) Vol. 2, pp. 442-447, Pergamon Press, London.
- (26) GROSSBARD, M.L., LAMBERT, J.M., GOLDMACHER, V.S., BLÄTTLER, W.A. AND NADLER, L.M. (1992) *Cancer Res.* 52: 4200-4207.
- (27) FOLKMAN, J. (1996) *Investigación y Ciencia* 242: 101-104.
- (28) RAAB, U., LASTRES, P., AREVALO, M.A., LOPEZ-NOVOA, J.M., CABAÑAS, C., de la ROSA, E.J. AND BERNABEU, C. (1999) *FEBS Letters* 459: 249-254.
- (29) GIRBES, T., FERRERAS, J.M., IGLESIAS, R., CITORES, L., ARIAS, J., ROJO, A., MUÑOZ, R., JIMENEZ, P. y MARTINEZ, F. (1994) patente internacional PCT/ES94/00020.
- (30) SARA, T., ROTH, J., ZUBER, C., STAMM, B. AND HEITZ, P. (1991) *Am.J.Pathol.* 139: 1435-1448.
- (31) GIRBES, T., ROJO, A., BENITEZ, J. Y MUÑOZ, R. (1999) patente inglesa 9916890.8
- (32) JAIN R. K. (1994) *Sci Am.* 271: 58-65. (82)
- (33) FRANKEL, A., TAGGE, E. AND WILLINGHAM, M. (1995) *Seminars in Cancer Biology* 6: 307-317.

- (34) WEINER, L.M.; O'DWYER, J.; KITSON, J.; COMIS, R.L.; FRANKEL, A.E.; BAUER, R.J.; KONRAD, M.S. AND GROVES, E.S. (1989) *Cancer Res.* 49: 4062-4067.
- (35) SIEGALL, C., LIGGIT, D., CHACE, D., TEPPER, M., AND PERRY, H. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91: 9514-9518.



**Día Mundial del agua**  
**Sesión celebrada en la Real Academia de Farmacia**  
**el día 22 de marzo de 1999**

**El Agua como vehículo de infección y de  
infestación**

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

*Académico de Número*

MANUEL DOMÍNGUEZ DE LA CALLE

*Licenciado en Farmacia. Especializado en Informática Médica*

El hombre utiliza el agua para cubrir muchas de sus necesidades personales y colectivas, devolviendo el sobrante al ciclo natural del agua pero ahora contaminada por tóxicos y por los microorganismos que se han multiplicado en el intestino humano.

Hipócrates (460 o 454 a 354 a.J.) destacó en su obra "Aires, Aguas y Lugares" la importancia del agua y recomendaba hervirla para evitar enfermedades lo cual indica que conocía el papel del agua en la transmisión de enfermedades. Herodoto escribió que los médicos de las escuelas egipcias aconsejaban hervir el agua para evitar las enfermedades intestinales. En el siglo XVIII Read achacó al agua de un pozo una epidemia de disentería acaecida en Metz y en 1814 Kruikshanks observó la aparición de un brote grave de cólera en un regimiento de infantería que bebía agua de unos aljibes, mientras que un batallón situado en una cota superior que bebía agua de pozo no presentó ningún caso. En

1823, el francés Dupré, sugirió que algunas epidemias de tifoidea podrían proceder del agua. John, en Londres, y casi simultáneamente William Budd, en Bristol, pensaron lo mismo. En la famosa epidemia de cólera de Londres de 1854-55 el Inspector de Sanidad John Snow estudió epidemiológicamente la distribución espacial de los casos, cuyos resultados publicó en la famosa monografía “The mode of communication of cholera”. Este trabajo permitió reconocer por primera vez que el cólera estaba asociado con el consumo del agua. Al estudiar las defunciones encontró esta distribución según el distrito:

Fuente de aprovisionamiento de agua	Número de defunciones por 10.000 viviendas
Southward y Vauxhall	71
Lambeths	5
Resto de Londres	9

Los casos se concentraban entre los que bebían el agua extraída con una bomba de un pozo situado en “Broad Street”, que se había contaminado a partir de un pozo negro de una casa vecina. Una señora que vivía lejos enfermó, pero se comprobó que bebía agua de dicho pozo a la que estaba habituada por haber sido vecina del barrio; en cambio quedaron exentos los trabajadores de una cervecería de la zona pues bebían cerveza y tampoco hubo casos en una fábrica textil de la zona pues tenían pozo propio.

El papel transmisor del agua se confirmó en la gran epidemia de Hamburgo de 1892 que causó según Jochmann unos 18.000 casos con 7.000 muertes debida al consumo del agua del Elba sin filtrar, mientras que en Altona, unos km aguas abajo contaminada con las excretas de Hamburgo, que tomaba el agua filtrado desde 1882-83 para no beber directamente el agua con las excretas de Hamburgo, tuvo una incidencia notablemente menor. (El Ayuntamiento de Hamburgo tenía proyectado filtrar el agua en 1893).

La suficiente disponibilidad de agua potable no sólo protege de las enfermedades hídricas sino que mejora la salud pública. A finales de 1894 el Inspector de Higiene Dr. Reinckte observó que la depuración del agua de Hamburgo bajó la incidencia de la tifoidea del 47 a 7, por  $10^5$  pero además disminuyó la mortalidad general de 24 por  $10^3$  habi-

tantes a menos de 17. Este fenómeno fué confirmado por el Ingeniero americano Mills (fenómeno de Mills y Reincke) al observar que en Lawrence la mortalidad por tifoidea que era de 121 bajó por la depuración del agua a 26 y la mortalidad general de 24,4 descendió a 20. En España este fenómeno fue confirmado por Murillo en 1921 en Vendrell ciudad en la que se captó higiénicamente el agua después de la epidemia de cólera de 1911 viendo que la mortalidad general que era de 93,7 en los años 1904 a 1910, bajó a 75,5 en los de 1913 a 1919. Mestre y otros sanitarios españoles confirmaron esos resultados. El ingeniero americano Hazen formuló este hecho matemáticamente con el llamado teorema de Hazen de que “por cada defunción evitada de fiebre tifoidea se suprimen al mismo tiempo dos o tres defunciones debidas a otras causas especialmente por gastroenteritis y bronquitis”. Están correlacionadas entre la mortalidad infantil y la distancia de la vivienda a la fuente. El efecto inespecífico del agua se debe a que permite una mejor higiene y además es un indicador indirecto de una mejora sanitario social general. El tracoma, la sarna, la pediculosis, el pian etc. están relacionados con un pobre abastecimiento de agua. Heysen y col. (1986) vieron en Perú en 1981 correlación entre la cobertura de agua potable, (además del grado de utilización de los servicios médicos y el salario medio) con la esperanza de vida al nacer que era en todo el país de 58 años. Hebert (1985) encontró que la calidad del agua condicionó en 626 niños menores de 36 meses de tres ciudades de Madras los parámetros antropológicos especialmente el peso.

El agua origina anualmente unos 900 millones de casos de gastroenteritis que matan a 3 millones de personas, unos 900 casos de parasitosis por nematodos y unos 200 casos de esquistosomiasis. En 1971 murieron en la India 360 personas por cada  $10^5$  habitantes por infecciones entéricas. La depuración de las aguas, sobre todo a partir de la introducción por Alexander Houston de su cloración para atajar el brote de tifoidea de 1906 en Lincoln. ha hecho descender mucho la incidencia de las enfermedades hídricas en los países desarrollados, pero aún continúa siendo un grave problema en los subdesarrollados. En 1994 la OMS estimó que morían anualmente 10 millones de personas como consecuencia de la contaminación del agua y que el 80 % de las enfer-

medades y mas del 30 % de las defunciones de los países en desarrollo están relacionadas con la escasez o con la mala cantidad del agua.

En EEUU desde 1920 a 1990 se han producido estos brotes:

Periodo	Numero medio de brotes anual	Número medio de casos por brote.
1920-30	23,2	400
1031-40	30,6	339
1941-50	31,3	172
1951-60	11,1	112
1961-70	13,1	354
1971-80	32,6	241
1981-90	29,1	225
1920-90	20,2	221

Las causas de esos brotes fueron:	Porcentajes
Aguas profundas sin tratar	26,5
Aguas profundas mal depuradas	16,5
Ingesta de agua en el baño	14,1
Inadecuada depuración de agua superficial	15,1
Deficiencias en la distribución	12,4
Deficiencias en la filtración	5,8
Ignorada	3,8
Agua superficial sin depurar	3,4

En los Estados Unidos la morbilidad debida al agua de bebida representaba el 40 % de la general en 1908 y en 1960 solo el 1,4 %

Mil millones de personas no tienen acceso a agua potable y otros 1.700 millones no disponen de red de saneamiento, pero incluso en Europa mas de cien millones de personas no tienen agua corriente y otras 250 millones carecen de red eficaz de saneamiento.

En España tenemos estos datos:

En 1982 se produjeron 25 brotes de enfermedades hídricas .

En 1985 se declararon estos brotes:

Microorganismo	Nº de brotes	Nº de afectados
Salmonella s.p	3	79
S. enteritidis	1	9
S. Tryphimurium	1	110
E. coli	3	497
Shigella sonnei	1	18
Shigella flexneri	1	12
Rotavirus	1	3
Virus tipo Norwalk Desconocido	1	1.828
Total	17	2.688
	29	5.244
En 1986 fueron:		
Salmonella sp	1	60
S. enteritidis	1	14
S.typhimurium	1	134
Shigella sonei	7	395 (35 hospitalizados)
Desconocido	27	2214

El máximo número de brotes se produjo en agosto con 13 y seguido de julio septiembre y octubre con 5 cada uno

Con objeto de optimizar el empleo de recursos en el abastecimiento higiénico de agua se han construido distintos modelos, que evalúan de diverso modo el abastecimiento de agua potable (cercanía a las viviendas, disponibilidad, calidad del agua, empleo de la misma etc.) comparándolos con indicadores de salud. El modelo de Cvjetanovic y Grab (1978) relaciona de forma sencilla los beneficios de las inversiones sanitarias con la reducción de la morbilidad por hídricas pero este y otros modelos son estáticos y no tienen en cuenta la permanente variabilidad de las condiciones en las que tiene lugar el estudio.

La OMS estableció en 1974 que podrían reducirse a la mitad las enfermedades diarreicas y la malnutrición en el tercer mundo mejorando el abastecimiento de agua y la eliminación de residuos. Esrey y cols. (1985) basados en 67 trabajos efectuados en 28 países determinaron que la mejora del abastecimiento de agua disminuiría en un 22 % la morbilidad y en un 21 % la mortalidad debida a diarreas. La ampliación en

1991 a 144 trabajos demostró que una adecuada depuración del agua reducía las enfermedades diarreicas un 26%, el tracoma un 27 %, la ascariasis un 29 %, la esquistosomiasis un 77 % y la dracunculiasis un 78%, con reducción aún mayor de su gravedad clínica. Estudios de casos-control efectuados por Young y col. (1988) en Malawi encontraron una disminución del 20 % en la incidencia de diarrea, Baltazar y cols. (1988) del 20 % en Filipinas, Daniels y cols. (1990) del 24 % en Lesoto. Wibow y col. (1993) en 14 distritos de Java en junio y julio de 1991 encontraron que la morbilidad y la mortalidad por diarreas eran inversamente proporcionales al producto del porcentaje de la población con agua potable por el porcentaje de la población con adecuada evacuación de excretas.

La llegada a un cauce de la décima parte de su caudal de su agua residual con 50 UFP por ml y con una eficacia de depuración natural del 90% hace llegar al grifo 5 virus por litro y si pasó previamente por una estación depuradora que reduce físicamente un 90 % los virus, unido a una depuración química con un rendimiento del 90%, daría un agua con una partícula cada dos litros, cantidad que suele estimarse como la que un adulto necesita para beber. Una buena depuración podría rebajar la concentración de UFP a 1 virión por 2 millones de litros es decir que se podría infectar diariamente una persona por millón de usuarios de los que alguno enfermaría. Cuando se alcanza un buen nivel de saneamiento la eficiencia de los recursos aplicados al saneamiento del agua disminuye. La repercusión de un suministro suficiente de agua potable en la salud sigue una curva logística de modo que cuando los niveles de saneamiento general son bajos, la eficacia es limitada y va aumentando exponencialmente a medida que la situación mejora. Esto pasa con otras actividades sanitarias. Por eso Walsh y col. (1979), Shival y cols.(1981) no encontraron que el abastecimiento y depuración del agua fueran eficaces para mejorar la Salud. La instalación de pozos en hogares en la zona del río Meghana de Bangladesh no redujo el cólera y Feachem y cols. ((1978) en Lesoto no encontraron disminución de enfermedades con programas de abastecimiento hídrico. Shiffman y cols (1978) no vieron diferencia en la incidencia de diarreas entre los habitantes de un pueblo guatemalteco que tenía un suministro moderno de agua respecto a otro sin él. Lo mismo encontraron Koopman y cols.

(1981) en Cali. Cuando la situación sanitario-social es buena la eficiencia del empleo de recursos en el saneamiento disminuye. Aunque la forma de la curva es universal los niveles en los que se efectúa la inflexión dependen de numerosos parámetros demográficos, económicos, sanitarios etc.

Paradójicamente el saneamiento del agua puede determinar un aumento de algunas enfermedades. Cuando hay una gran diseminación de los virus poliomiélicos, del de la hepatitis A entre otros, la mayoría de las infecciones que causan se dan en la infancia dando una gran frecuencia de casos inaparentes y benignos y raros los sintomáticos (parálisis en el caso de la polio) pero si el agua está depurada la infección se desplaza hacia edades mayores en las que la clínica es mas grave. Payne estableció que cuando la mortalidad infantil es superior a 100, la morbilidad de la parálisis poliomiélica es del orden de 2 por  $10^5$  y cuando la mortalidad infantil baja a 50 la morbilidad poliomiélica asciende a 20-50 y si la mortalidad infantil es de 250, la morbilidad por poliomiélica es de 1. Este fenómeno no es privativo de las hídricas pues también se produce en la rubeola, en la parotiditis, en la mononucleosis infecciosa etc.

#### TRANSMISIÓN DE MICROORGANISMOS POR EL AGUA.

El hombre utiliza el agua captada en todas las fases de su ciclo natural, para cubrir sus necesidades (bebida, limpieza, personal y doméstica, confeccionar alimentos, para la actividad industrial, como refrigerante y para riego) y una vez usada la devuelve al ciclo natural pero a menudo contaminada por numerosos productos químicos (y físicos como es el calor) y sobre todo con microorganismos que pueden ser patógenos. La contaminación puede tener lugar en cualquiera de las etapas del ciclo del agua, evaporación, nubes, lluvia, escorrentía, ríos, lagos, mar, filtración a través de la tierra, circulación freática, emergencia en pozos, fuentes, etc, La percolación en el suelo hace disminuir los microorganismos y a los 30 a 50 cm han desaparecido los enterovirus por su adsorción en las partículas de tierra en donde pueden persistir mucho, hasta que la llegada del agua las separa y moviliza por elución y por desorción pudiendo pasar a pozos, aguas superficiales etc.

En este ciclo, que supone movimiento, el agua se emplea de forma deliberada o no para arrastrar y diluir desechos industriales domésticos, excretas etc. El origen más importante de la contaminación del agua es el vertido directo de aguas residuales por medio del alcantarillado que aboca a aguas superficiales (ríos, lagos, embalses) desde donde por lixiviación del suelo pueden pasar a las aguas profundas y al final pueden contaminar el mar. También tienen importancia las filtraciones de pozos negros, o los cruces entre alcantarillas y conducciones. El hombre levantó sus ciudades en riberas no para captar fácilmente el agua sino para disponer de un sistema fácil de eliminar sus excretas aprovechando la propiedad de fluir del agua. Los romanos no tomaban el agua que necesitaban para beber del Tíber, sino del Arno a muchos kilómetros de distancia. La utilización del agua superficial especialmente la de los ríos como medio de eliminar aguas residuales hace que las ciudades situadas aguas abajo beban agua de alcantarilla como pasa con los habitantes de Agra, la ciudad del Taj Mahal, que beben el agua de las alcantarillas de Delhi. También el agua se puede contaminar con los riegos. Como media cada  $m^2$  de tierra requiere al año  $1 m^3$  de agua parte de la cual va a los cauces y parte se filtra en el suelo llegando al agua freática. Para poder evacuar aguas negras en tierra no se deben sobrepasar  $100m^3$  por  $m^2$  al año pues volúmenes mayores disminuyen la autodepuración que depende de la composición y estructura del suelo, de su microflora y de la temperatura.

El agua subterránea o freática suele tener menor carga microbiológica que la superficial pues el suelo retiene a muchos microorganismos y no ofrece medio adecuado para su persistencia y aún menos para su multiplicación. Comarro y cols (1988) encontraron en el agua de 80 pozos de las cercanías de Santiago de Compostela y de otros lugares de La Coruña que el 64 % tenían coliformes ( el 24 % fecales y el 21 % *E. coli*), el 36 % estreptococos fecales, el 32 % clostridios sulfito reductores. En resumen solo el 25 % tenía agua potable y el 21 % aceptable previa cloración.,

La contaminación microbiológica del agua puede proceder de los cadáveres, excretas y productos de la gestación (como es el caso de la brucelosis) de los animales. Es importante diferenciar si la contaminación del agua procede de excretas humanas o animales. La presencia

de *Rhodococcus coprophilus* (Mara y col 1981, Oragui y col. 1983) y del *Streptococcus bovis* (Cooper y col. (1955), Tilton y col.(1967, Geldreich y col. (1969), Oragui, y col. (1981,1984) indican procedencia animal mientras que la de bifidobacterias, especialmente las cepas fermentadoras de sorbitol indican contaminación fecal humana (Resnick y col. 1981, Mara y col, 1983).

El origen más importante de la contaminación es sobre todo el hombre, portador o enfermo, quién excreta los agentes por vómitos, leche, orina y especialmente por las heces, que en ciertas enfermedades son diarreicas, que contienen enormes cantidades, ya que los microorganismos se reproducen en el intestino, y la *S. typhi* en el árbol biliar. Las heces humanas recientes pueden contener  $10^{5-8}$  UFP (unidades formadoras de placas) o de otro modo 10 a 10.000 DICT<sub>50</sub>(dosis capaz de infectar al 50 % de cultivos de tejidos).

Los gérmenes de las heces llegados al suelo, perviven un lapso que depende de las propiedades del suelo, de la temperatura, de la concurrencia microbiana etc. La desecación disminuye rápidamente la densidad de las bacterias entre ellas la de los coliformes de modo que a los 30 días solo queda el 1 %. La *S. typhi* puede resistir unos 15 días en heces sólidas o en el suelo seco y hasta 30 días si conserva la humedad; las otras salmonellas hasta 60 días y las shigellas hasta 70 días.

El agua no es un buen medio de cultivo, de modo que la supervivencia y aún más la multiplicación de los gérmenes es escasa, dependiendo de una serie de factores como la temperatura, materia orgánica, acidez, salinidad, oxígeno disuelto y la presencia de protozoos y fagos específicos de cada bacteria. En el agua los microorganismos están mas protegidos que en la tierra, pues no tienen el riesgo de la desecación, la concurrencia bacteriana es menor, y los UV solo actúan en los muy someros, mientras que en el agua están diseminados en diferentes profundidades.

Germen	Medio	Días de supervivencia
Coliformes	Suelo	30
	Tomates	35
Salmonella typhi	Suelo	2 a 85

	Vegetales	7 a 53
Shigella	Tomates	2 a 7
Vibrio cholerae	Espinacas, Lechugas	22 a 23
	Vegetales no ácidos	2
Bacilo de Koch	Suelo	Más de 2 años
	Rábano	3 meses
Entamoeba histolytica	Vegetales	3
	Suelo	8
Huevos de ascaris	Suelo	Más de 7 años
Suelo		
	Vegetales	27 a 35
Virus de la poliomyelitis	Suelo	100
	Rábanos, lechuga	35

Los esporos bacterianos perviven años y algunos de forma indefinida. El viento, las escorrentías etc. llevan a los microorganismos al agua. El agua se puede además contaminar con basuras las cuales pueden contener heces por ej. la de los pañales arrojados a ellas.

En general, las epidemias hídricas se producen cuando no media mucho tiempo entre el momento de la contaminación del agua y su consumo, pues en este caso los gérmenes están expuestos durante menos tiempo a los mecanismos naturales de depuración.

Las catástrofes pueden provocar la contaminación de las aguas al favorecer la conexión de embalses, depósitos y conducciones con aguas residuales o contaminadas. El 14 de agosto de 1998 se desplomaron 500 m de un dique del río Nenjiang un día después de haberse comunicado la existencia de casi 600 casos de disentería en la zona de Harbin. Otra posibilidad es la contaminación deliberada del agua en guerras o sabotajes con microorganismos patógenos. (la adición al agua de toxinas bacterianas especialmente la botulínica no es guerra bacteriológica sino química, aunque el agente sea de procedencia biológica)

La mayoría de los problemas se deben al agua superficial. En las grandes poblaciones el abastecimiento de aguas consta de un sistema de captación del agua en su origen, de estación depuradora, de sistema de

conducción, de depósitos y una red de distribución. A mediados del siglo XIX se generaliza la contaminación microbiana del agua debido al aumento demográfico, al desarrollo industrial y a la urbanización. Las aguas superficiales están contaminadas sistemáticamente porque a ellas desembocan las aguas residuales, domésticas e industriales de las poblaciones asentadas en las cuencas. La contaminación microbiana en la captación se puede corregir en las estaciones de depuración, si funcionan bien pero la carga orgánica que pueden recibir puede causar la formación de trihalometanos y otros derivados con el cloro; más grave es la contaminación que se produce en las conducciones, depósitos y sobre todo en la red de distribución, por roturas, fugas y comunicación con aguas residuales, en especial cuando se reanuda el suministro por la succión, por el efecto de bomba de vacío pues el subsuelo de una gran ciudad está constituido por un laberinto de redes de los distintos servicios, con múltiples posibilidades de contaminación a través de la red de aguas residuales. Las epidemias más extensas se han producido por la contaminación de la red de abastecimiento. Una vez transcurrido el límite inferior del período de incubación, aparecen en un corto número de días una serie de casos que aumentan en número rápidamente; es la transmisión holomíantica. En el medio rural lo más frecuente es la contaminación de los pozos romanos por los pozos negros que se encuentran en sus inmediaciones, de las fuentes y manantiales por filtraciones a través de terrenos de cultivo abonados con excretas humanas, sobre todo después de las lluvias, o de las aguas subterráneas en terrenos calizos, por las grietas que se producen que hacen inoperantes los mecanismos de filtración natural.

Aunque, en general, cualquier bacteria patógena puede llegar al agua y propagarse por este medio, en la práctica esta posibilidad se limita a un corto número de gérmenes que, al eliminarse por las heces u orina de los enfermos o portadores, tienen mayores probabilidades de llegar a las aguas en cantidad suficiente para producir enfermedades que pueden manifestarse en forma epidémica.

El Código Alimentario Español, ya establecía en su artículo 3.27.11, que debían preferirse para captar el agua para el abastecimiento de núcleos urbanos en primer lugar el agua de manantiales o fuentes, luego la de pozos artesianos, en tercer lugar las aguas subálveas y finalmente las superficiales. En general las aguas superficiales, sobre todo aquellas

que reciben desagües domésticos son las más peligrosas pero hoy día no se puede considerar que un agua natural pueda ser utilizada sin depurar como bebida. Muy lejos estamos de aquello del Quijote (Cap XI, de la 1ª parte) “Dichosa edad y siglos dichosos...Las claras fuentes y corrientes ríos en magnífica abundancia sabrosas y transparentes aguas les ofrecían” o de “la claridad de las aguas del Ebro” a su paso por Zaragoza (Cap XXIX 2ª parte)

Se especula con la posibilidad de que los gérmenes en el agua puedan pasar a una forma durmiente en la que permanecen viables aunque o cultivables y que en un momento determinado pudieran producir la infección. Colwell y cols. en 1992 observaron que varias bacterias patógenas, entre ellas el vibrión cólerico en medios pobres en nutrientes, con una determinada concentración salina y baja temperatura, reducen su tamaño convirtiéndose en formas filtrables, que pueden sobrevivir durante años. Estas condiciones se dan en esteros y en ambientes marinos.

Las aguas subterráneas o freáticas, consideradas clásicamente como bacteriológicamente puras, están contaminadas, sobre todo las más someras, por la enorme carga microbiológica del suelo y de las aguas superficiales, las cuales, al llegar a determinadas zonas de fácil penetración (zonas de vulnerabilidad). sobre todo si hay diaclasas se mezclan con las subterráneas, contaminando peligrosamente los acuíferos. Hoy no hay fuente o pozo cuya agua se pueda beber sin riesgo, hecho habitual hasta los años cincuenta

Deben distinguirse los agentes en los que el agua solo sirve para diseminarlos sin que se multipliquen como pasa con los virus (algunos se pueden multiplicar en organismos acuáticos) y desde luego los fagos que no son patógenos. Los quistes de protozoos parásitos como los de las amebas, de giardias etc. ni los huevos de los metazoos se pueden multiplicar en el agua. La mayoría de las bacterias que llegan al agua no se reproducen en ella. Otras, si pueden hacerlo según las condiciones del hábitat. El desarrollo microbiano en la red de distribución puede deteriorar la calidad del agua (O'Connor y col. 1975) Bourbigot y col. 1984). Si se trata de patógenos su crecimiento pudiera suponer riesgo de infecciones teniendo en cuenta la débil concentración de cloro que puede existir en los terminales .

Un factor epidemiológico importante es la capacidad de los microorganismos patógenos para resistir y en algunos casos de multiplicarse que dependen, además del tipo de microorganismo, de las condiciones físicas y químicas del agua como temperatura, pH, concentración iónica, aireación, materias contenidas, exposición a la luz solar, flora del agua etc.

Los microorganismos y sobre todo los virus, se adsorben fácilmente a la arcilla, margas arenosas, materia orgánica, carbón activo, diatomeas, kaolinita, bentonita, algas bacterias vidrio, membranas, yeso etc. del agua en condiciones adecuadas pero al cambiar la temperatura, o el pH, se produce la desadsorción; los enterovirus se adsorben mucho hasta un 90 % en las partículas pero los rotavirus muy poco. Adheridas a partículas los virus prolongan su supervivencia. Smith y cols (1978) encontraron que los virus Echo y Coxsackie B3 perviven al menos 18 días, los poliovirus 14 y los Coxsackie A9 4 días en los cienos de los estuarios

Las partículas que miden más de 6 micras se sedimentan enseguida mientras que las de tres o menos micras quedan suspendidas mucho tiempo. La sedimentación elimina del agua a los virus adheridos a las partículas suspendidas, pero el limo actúa como depósito de virus ya que contiene entre 10 a 10,000 veces mas viriones que el agua contiguo. Gerba y cols encontraron en agua y sedimento marinos estas UFP

Lugar de la investigación	UFP en 100 l de agua	IFP en 100 l de sedimento
En de Hollywood	0,3	3160
En Miami	0,5	2160
Playa de Miami	7,3	9830
Canal costero de Texas a 1 m de afluencia de aguas negras	160	2000
Canal costero de Texas a 200 m de la afluencia de aguas negras	90	2080

Las partículas de cieno se resuspenden por movimientos del agua, dragados, paso de barcos etc. y pueden ser llevadas lejos. Pese a ello se encuentran microorganismos entre ellos virus a 45 m de profundidad en suelos arenosos con alguna arcilla y limo regados por aspersión. Aparte el

sulfato aluminico, el hidróxido cálcico, las sales de hierro como polielectrolitos eliminan más del 99,99 % de los virus que no se inactivan pero quedan en los lodos. El aumento del pH por adición de hidróxido cálcico reduce mucho la cantidad de virus. El cloro no actúa si hay mucha materia orgánica, y su efecto depende de la concentración de materia orgánica, de su agregación en partículas, del pH y de la temperatura. Con 40 mg 000 se destruye el 99,9 % de los virus entre 3 a 120 minutos de contacto.

El desarrollo microbiano en la red de distribución puede deteriorar la calidad del agua (O'Connor y col. 1975) Bourbigot y col. 1984) Si se trata de patógenos su crecimiento pudiera suponer riesgo de infecciones teniendo en cuenta la débil concentración de cloro que puede existir en los terminales .

## EL AGUA COMO MEDIO DE REPRODUCCIÓN

Los gérmenes patógenos sufren un proceso de dilución que constituye el principal mecanismo de autodepuración de las aguas. El agua no es un buen medio de cultivo, de modo que la supervivencia y aún más la multiplicación de los gérmenes es escasa. En estos casos el agua actúa solo diseminando los microorganismos que contiene. Pero el agua puede permitir el crecimiento bacteriano, según la temperatura, la concentración de la materia orgánica, acidez, salinidad, oxígeno disuelto y la presencia de protozoos y fagos.

1º Capacidad nutritiva del agua en los diversos medios como embalses, corrientes o conducciones. El agua puede permitir el crecimiento bacteriano si contiene pequeñas cantidades de carbono orgánico asimilable (COA) (van der Kooij y col.1982, Huck, 1990), especialmente de aminoácidos, péptidos, ácidos grasos e hidrocarburos, en tan mínimas cantidades que solo se pueden determinar por bioensayos complejos. El máximo crecimiento bacteriano (Nmax) que cada muestra de agua puede promover se determina bajo condiciones de trabajo estandarizadas utilizando cepas adecuadas de bacterias estándar o de mezclas de bacterias autóctonas haciendo el recuento en placas, o por turbidez o por ATP (van der Kooij y col., 1982, Jago y Stanfield 1984, Huck1990, Ribas y col.1991, Frías y col. (1992) El COA es una fracción del carbono orgánico biodegradable CODB, a su vez parte del carbono orgánico disuelto

COD y este a su vez del carbono orgánico total, CO, del que solo una mínima parte es asimilable por las bacterias, siempre que haya suficiente concentración de nitrógeno y de fósforo. La mayor parte de los ambientes hídricos naturales, incluyendo las conducciones de agua para bebida, tienen bajas concentraciones de nutrientes, especialmente de carbono orgánico (Morita 1988, Matin y col. 1989). Se conoce la afinidad de muchas bacterias del agua para diferentes compuestos orgánicos (van der Kooij y col. 1982; van der Kooij y Hijnen 1983, 1985). Nakamura y col. (1989). El COA se evalúa midiendo el consumo del carbono orgánico disuelto incubando el agua con una suspensión de bacterias autóctonas o con arena conteniendo bacterias con gran capacidad de biodegradar. (Joret y Levi, 1986; Servais y col. 1987). Van der Kooij y col. (1982) midieron la concentración del carbono orgánico asimilable en el agua de bebida evaluando el crecimiento de la cepa P17 de *Pseudomonas fluorescens*, específica del agua, muy versátil nutritivamente, capaz de multiplicarse con fuentes de nitrógeno simples como el acetato, sin requerir factores de crecimiento especiales pero como la cinética de crecimiento del P17 depende de muchos factores, no se debe considerar como método estándar.

2° Concentración de oxígeno. Demanda bioquímica de oxígeno del agua. El agua natural contiene entre 300 y 500 mg 000 de oxígeno disuelto por litro, procedente de la fotosíntesis pero sobre todo de la disolución del oxígeno atmosférico; por eso las aguas profundas contienen poco oxígeno. Los organismos aeróbicos especialmente si hay luz lo consumen en su respiración. La concentración de oxígeno disminuye con la temperatura porque aumenta la volatilidad y el consumo aeróbico del oxígeno; y así un litro a 10°C contiene como media 14,5 mg; a 15°C 10 mg y a 20°C 9 mg.

La mayor parte de la materia orgánica es biodegradable, oxidándose con el oxígeno sirviendo de nutrientes a organismos acuáticos especialmente a las bacterias y protozoos.

La cantidad de oxígeno necesaria para estabilizar las sustancias orgánicas biodegradables se denomina “demanda bioquímica de oxígeno” abreviadamente DBO. La DBO se puede medir al cabo de diversos tiempos. En general se emplea la DBO<sub>5</sub> es decir al cabo de cinco días. Se determina por métodos manométricos que utilizan mercurio con sus incon-

venientes. El Oxitop de la casa WTW no requiere mercurio que controla la temperatura y la agitación con lectura digital que mide valores de DBO desde 0 a 5.000 mg por litro.

La demanda química de oxígeno, DCO o DQO, es el oxígeno que requieren las materias oxidables del agua para su oxidación espontánea. Las sustancias inorgánicas y una parte de las orgánicas como los pesticidas, no son reductoras, y por ello no disminuyen el oxígeno disuelto.

En general, un agua con menos de 4 mg/l de oxígeno disuelto no es apta para el desarrollo de la vida en su seno. Esta carencia de oxígeno aparece en aguas profundas o muy polucionadas.

3° Autodepuración. Se suele decir que la dilución es el mejor mecanismo de depuración del agua pero en realidad lo que hace la dilución es disminuir la probabilidad de que, si se bebe el agua se produzca enfermedad a expensas de extender topográficamente el riesgo. La sedimentación que tiene lugar cuando la velocidad de la corriente es inferior a 0,3 m por segundo, contribuye a eliminar microorganismos del agua pero los mantiene en el cieno; cuando se remueve el cieno por las crecidas etc. se resuspenden los gérmenes. La autodepuración se produce por la oxidación de los compuestos orgánicos, entre ellos los microorganismos que se descomponen y mineralizan, proceso realizado por los propios microorganismos, en general bacterias, del agua natural o de los vertidos.

La llegada a una colección de agua de materia orgánica, procedente de aguas residuales, desechos de fábricas (mataderos, mercados, fábricas de conservas), vertidos de basuras, lavaderos, fábricas de papel, etc. a agua dulce o salada se producen reacciones de precipitación, coagulación y floculación. Por ejemplo, los jabones forman productos insolubles o coloidales con el calcio y magnesio del agua del mar, sedimentando el precipitado o enturbiando el agua. Ello origina trastornos en la fauna del fondo o, en el segundo caso, al disminuir el paso de la luz, baja la productividad del medio marino. Otros cambios químicos son la formación de bicarbonato cálcico por la reacción del hidrato cálcico con el anhídrido carbónico disuelto en el agua. Los bicarbonatos reaccionan con los ácidos llegados al agua, formando sales insolubles que precipitan. El aporte de materia orgánica origina una serie de cambios por procesos físico-químicos y sobre todo biológicos, del agua receptora, fácilmente observables en los ríos, que se suceden secuencialmente en el espacio y

en el tiempo desde el punto y momento de la llegada del efluente diferenciándose cuatro tramos de longitud variable según la actividad biológica relacionada con la degradación de la materia orgánica hasta su mineralización al transformarse en nitratos.

Los cuatro tramos o zonas son:

1° Zona de degradación, o polisapróbica. En ella la polución es elevada, con abundante materia orgánica mucha de ella putrefacta por el inicio de su descomposición por las bacterias que consumen mucho oxígeno por lo que este gas disminuye rápidamente, dejando solo el 40 % de saturación. Las formas superiores de vida, vegetales verdes y animales (peces, crustáceos, moluscos, anfibios etc) desaparecen siendo reemplazadas por otras inferiores más tolerantes como las bacterias anaerobias. Las aguas en esta zona tienen aspecto sucio, con producción de indol, de escatol etc.

2° La zona de descomposición activa o alfa-mesosapróbica en la que desaparece el oxígeno disuelto y la DBO es muy alta y hay por ello un gran desarrollo de los gérmenes anaeróbicos que descomponen a la materia orgánica. Las aguas tienen un aspecto parduzco o negro, apareciendo lodos flotantes y sedimentos negruzcos por el sulfuro ferroso formado. La putrefacción de las proteínas origina aminoácidos, alcoholes y metano, amoniacal y sulfhídrico, la de los hidrocarbonados ácidos grasos, alcoholes, indol; se desprende hidrógeno y anhídrico carbónico. La descomposición de las grasas libera ácidos grasos, glicerina, alcoholes, así como hidrógeno y carbónico. El amoniacal y el sulfhídrico y otros gases dan olor nauseabundo. Esta fase termina cuando la tangente de la curva de la concentración del nitrógeno amoniacal en su punto más alto llega a 0,4. La cenobiosis está formada casi exclusivamente por polisaprobios que llegan a tener una concentración de un millón por ml. Típico de esta zona es el *Sphaerotilus natans* que es una clamidobacteriacea que forma el "sewage fungus" es decir una masa blancuzca a grisácea en la que se desarrollan hongos, bacterias y protozoos. También contiene *Beaggiática alba*, *Zooglea ramigiera*, y algas de los géneros *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina*, *Anabena* etc. En el cieno se desarrollan los rotíferos *Rotaria neptunia* y *Rotaria* así como metazoos que resisten al amoniacal y al sulfhídrico y viven en el fondo, respirando el escasísimo oxígeno disuelto. Hay predominio de la asimilación de la materia orgánica que deja en

los márgenes unos depósitos mucosos. En el limo hay anélidos del género *Tubifex*

3° La zona de recuperación o beta-mesosapróbica de más duración y por ello es en ríos mas larga que la anterior, el agua va adquiriendo gradualmente sus condiciones normales, empieza a haber oxígeno disuelto, la DBO disminuye aparecen gérmenes aerobios, algas aerobias con clorofila esquizomicetos filamentosos que se desarrollan en márgenes y cieno flora que inicia la oxidación de los materiales, desapareciendo la putrefacción y los malos olores, aunque se siguen transformando los materiales orgánicos que no lo hicieron en la fase anterior y los aminoácidos, los ácidos grasos se transforman en cuerpos más simples y el nitrógeno de la materia orgánica se ha convertido en nitritos y luego en nitratos, los alcoholes y los ácidos grasos se descomponen en CO<sub>2</sub> y en agua. La turbidez disminuye, dejando pasar luz y por la existencia de sales aparecen algas, y vegetales que por su función clorofílica liberan oxígeno que pasa al agua. Se desarrollan diatomeas de los géneros *Fragilaria*, *Stenphanodiscus*, *Cosmarium*, *Navícula*, *Nitzchia*, *Diatoma*, *Cyclotella*, *Melosira*, *Surirella*, *Synedra*, *Cloesterium* y un gran número de cianofíceas y clorofíceas que aumentan a medida que mejora la calidad del agua. Hacen su aparición protozoos que se nutren de bacterias como la *Euglena viridis*, flagelado con clorofila, los también flagelados *Bodo putridus*, *Cercobodo longicauda*, *Oicomonas mutabilis* y ciliados como el *Paramecium putrinum*, el *Colpidium colpoda*, el *Chilodonella cucullus*, la *Verticella microstoma*, los *Glaucoma scintillaris* y *pyriformis* etc. Adheridas a las piedras viven larvas del género *Chironomida* aprovechando el escaso oxígeno así como las larvas de *Culex*, *Eristalis* y *Psicodidae* que respiran el oxígeno del aire. El sulfhídrico y el sulfuro cálcico pasan a sulfato cálcico que se precipita. Las sales ferrosas pasan a férricas, el sulfuro ferroso a hidrato férrico. Las aguas se van volviendo más claras, reaparecen los vegetales verdes y se va elevando progresivamente el contenido de oxígeno hasta que su contenido se acerca a la saturación.

Si la carga orgánica del agua ha sido excesiva, para el caudal hídrico se produce la eutrofización por el desarrollo explosivo de microorganismos saprofitos algas y plantas que puede llegar a dificultar la navegación, bloquear las tomas de agua y como consecuencia de su enorme desarrollo agotan el oxígeno del agua impidiendo la vida de ve-

getales y de peces y la descomposición aeróbica de la materia orgánica etc. Se debe al aporte de nutrientes como nitratos, fosfatos (de los abonos y de los detergentes) y a los formados en las fases anteriores de la autodepuración y a veces de vitaminas de las aguas residuales; en cambio hay gran desarrollo de anaerobios que producen la putrefacción de la materia orgánica. El ecosistema se degrada, perdiendo su capacidad de regeneración. El fósforo y el nitrógeno aportados por las aguas residuales estimulan el crecimiento incontrolado de algas en los lagos, embalses y cauces de los ríos y en el mar. Las algas verdeazules *Aphanizomenon flosaquae*, la *Anabaena spiroides* y la *Oscillatoria rubescens* inicialmente, por la fotosíntesis, oxigenan el agua pero a medida que mueren se pudren absorbiendo oxígeno. El desarrollo de algas cianofíceas determina la formación de toxinas peligrosas para otros seres acuáticos, y además pueden provocar trastornos respiratorios, gastroenteritis y dermatosis. El desarrollo desmesurado de las algas altera enormemente la calidad de las aguas, que adquieren mal sabor y olor y a veces llegan a obstruir las salidas del agua. La eutrofización es casi universal estando en casi todas partes superada la capacidad de autodepuración natural.

4° Zona de aguas limpias u oligosapróbica. En ella el agua tiene características casi similares a las de las aguas limpias naturales, existiendo en su seno de forma normal la vida vegetal y animal propias de las corrientes que solo tienen la polución natural o geoquímica. Esta fase, termina cuando la tangente de la curva de variación del nitrógeno de los nitratos es menor de 0,3 en la proximidad del máximo aunque Elvira, para que coincida con la aparición de los saprobios alarga a menos de 0,1. La flora microbiana, muy disminuida, está formada por oligosaprobios aunque en el lodo persisten mesosaprobios y reaparece el fito y el zooplancton (ya habían aparecido antes los rotíferos) que captan sales.

5° Zona de pureza xenosaprobica o kataróbica. Está caracterizada porque el agua tiene las propiedades normales del agua natural. Aparecen batracios y a partir de 2,5 mg de oxígeno por litro aparecen los peces (las truchas a a partir de los 5 mg) Contiene una flora autotrofa, variada especialmente compuesta por *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Bacillus*, los cuales se aíslan a menudo en agua de bebida (LeChevalier y col., 1980 ; Reasoner y col.1989; van der Kooij y col., 1982 ; van der Kooij y

Hijnen, 1985, 1988). Los gérmenes están suspendidos de forma aislada o en pequeños grupos o fijados a las partículas minerales u orgánicas constituyendo la flora epipsámica, o adherida a la superficie de los vegetales (epífita) o a la de los animales acuáticos (epizoica) y por bacterias de la flora epibéntica del suelo que recubren las piedras y el cieno de la que forman parte las bacterias-algas del tipo de las *Spherotillia*, *Crenothrix*, *Gallionella*, *Beggiatoa* que forman grandes masas. También puede contener ferrobacterias con cubierta mucilaginosa en la que están embebidos hidróxidos trivalentes de hierro y de manganeso tingsibles por ello selectivamente con ferrocianuro potásico y clorhídrico diluido. El agua contiene también sulfobacterias. Los fagos se desarrollan sobre bacterias específicas pudiendo servir de indicadores de su presencia en el agua. Otro germen acuático es el *Bdellovibrio bacteriovorus* procedente del suelo o de las aguas residuales, se fija sobre los gérmenes destruyéndolos por enzimas proteolíticas.

Se puede cuantificar la situación de un tramo de un río o una zona de un depósito utilizando diversos criterios. Los índices bióticos, relacionan la fauna macroinvertebrada con la calidad del agua pues los tramos contaminados contienen fauna homogénea muy tolerante a los contaminantes, mientras que las zonas limpias contienen flora variada de especies intolerantes a la contaminación. El índice de Chandler (1970) y el semejante de Woodiwis (1964) se basa en la presencia de macroinvertebrados bénticos adheridos a las piedras según grupos y fue aplicado por este autor en el río inglés "Trent".

Macroinvertebrado presente		0 a 1 grupo	2 a 5 grupos	6 a 10 grupos	11 a 15 grupos	16 y más grupos
Ninfas de Pleopter	Mas de una especie	-	VII	VIII	IX	X
	Solo una especie	-	VI	VII	VIII	IX
Ninfas de Ephemeroptera	Mas de una especie excluyendo el <i>Beatis rhodoni</i>	-	VI	VII	VIII	IX
	Solo una especie excluyendo el <i>Beatis rhodoni</i>	-	V	VI	VII	VIII
Larvas de Trichoptera	Mas de una especie incluyendo el <i>Beatis</i>	-	V	VI	VII	VIII

	rhodani						
	Sola una especie incluyendo el <i>Beatis rhodani</i>	IV	IV	V	VI	VII	
Gammarius	Todas las especies anteriores ausentes	III	IV	V	VI	VII	
Asellus	Todas las especies anteriores ausentes	II	III	IV	V	VI	
Gusanos tubífid y/o larvas de Chironómidos	Todas las especies anteriores ausentes	I	II	III	IV	-	
Todos los tipos anteriores ausentes	Algunos organismos que no requieren oxígeno disuelto como <i>Eristalis</i> pueden estar presentes	0	I	II	-	.	

Fernández Leborata y Fernández Galiano (1979) utilizan lo que llaman valencias sapróbicas de cada especie de ciliado, teniendo en cuenta: los límites físico-químicos y bióticos de cada clase, las características físico-químicas del agua (temperatura, materia orgánica y condiciones respiratorias) y los valores obtenidos por Zelinka y Marvan 1961; Sladeczek 1969; Bick 1972). Unas especies se desarrollan en determinadas estaciones mientras que otras se encuentran durante todo el año. Hay relación inversa entre el contenido de gérmenes incluida la *S. typhi* y los flagelados *Bodo butans* y *Bodo ovatus* (Hüntemuller 1905) y con el *Colpoda cucullus* (Storvis y col.1911) efecto que podría ser casual o debido a un efecto depurador de esos flagelados.

#### PAPEL VEHICULADOR DEL AGUA

Los esporos del agua no producen directamente enfermedad pero por ej. la contaminación de una herida por esporos de clostridios del agua puede producir gangrena o tétanos; la ingesta de agua con ellos puede determinar la colonización intestinal que podría causar septicemias. Esa agua puede contaminar alimentos en los que los *Clostridium perfringens* y el *botulinicum s* producen toxinas. Se han encontrado esporos del *C. botulinum* en aguas costeras del Japón, Países Bálticos, Francia etc. El agua

participa en la transmisión contaminando pastos con esporas de *B. Anthracis*.

El agua puede vehiculizar quistes de protozoos dotados de fuerte pared. Los resistentes huevos de los nematodos ascaris, trichocephalos, larvas de anquilostomas, necator, strongiloides, toxocaras (canis y cati) etc. suelen ser depositados en el suelo desde donde pueden llegar al agua. En cambio el agua no transmite la oxiuriasis ya que el huevo se rompe en el agua. Los huevos de los cestodos protegidos por fuertes envolturas pueden llegar al agua y desde ella a los huéspedes intermediarios; los huevos de las tenias pueden causar cisticercosis en bóvidos en el caso de la tenia saginata o en el cerdo y hasta en el hombre el de la solium. También pueden llegar al agua el gusano de Medina o de Guinea, el racunculus medinensis o pequeño dragón de Medina, que probablemente eran las feroces serpientes que atacaron a los israelitas después de atravesar el Mar Rojo, común en muchas áreas tropicales.

Además el agua puede servir de hábitat a larvas de Aedes vectores de la fiebre amarilla por Aedes, de Anopheles que lo son del paludismo, de Culex, Chiropters, Cyclops vehiculadores de la dracunculosis. Los Simulium damnosum y narvi en Africa y el S. othraceum en América Central, culícidos de aguas limpias y rápidas vehiculan las larvas de filarias y de Wuchereria y de la Onchocerca volvulus que vive en el tejido subcutáneo y conectivo del hospedador y otros culícidos transmisores de arbovirosis, En el agua se desarrollan moluscos, crustáceos, peces y plantas que actúan como hospedadores intermedios de fasciolas. El Jacinto de agua, la Eichhornia crassipes y las algas además de alterar el agua, sirven de hábitats a caracoles que pueden servir de reservorios a bilharzias, dracunculos, trichostrongiloides etc.

También el agua puede actuar como hábitat de metazoos como los trematodos causantes de la fasciolosis (*F. hepática* y gigante), esquistosomiasis que tienen como hospedador intermedio a caracoles acuáticos de los géneros *Limnaea* mas vegetación acuática en la que se enquistan las metacercarias de *Fasciola hepática* o la de la *F. busckii* (*Planorbis* más vegetación acuática). El *Dibothriocephalus latus* requiere para cumplir su ciclo *Cyclops*, crustáceos y peces del agua dulce como los sollos, percas etc. Los caracoles *Planorbis* con la vegetación en la que se desarrolla la *F. busckii* cercarias las *Bilharzias hamatobium*, la *mansoni*, la *japonica ubi-*

cuas. Los trematodes pulmonares el *Clonorchis sinensis* y *felineus*, el *Paragonimus westermanni* solo afectan áreas limitadas. *Oncomelania* , *Bulinus*, etc. o bien de copepodos como los *Cyclops* en los que se desarrollan formas larvianas de botriocéfalos y dracunculosis (*D medinensis*).

Lima y cols. (1987) obtuvieron datos del 99 % de los hogares y del 82% de los habitantes de Comercinho al sureste de Brasil encontrando mas tasas de personas con huevos de *S mansoni* en aquellos hogares en los que el cabeza de familia realizaba trabajos manuales, y en los que no tenían agua al grifo . Había menos en los mayores de 15 años.

#### LA TRANSMISIÓN POR EL AGUA COMO BEBIDA.

El principal mecanismo de transmisión de enfermedades por el agua es su utilización como bebida o al consumir alimentos contaminados por el agua de riego con microorganismos o confeccionados con agua contaminada o por el consumo de verduras crudas abonadas o regadas con aguas residuales. Hay casos curiosos como la transmisión de salmonelosis por pollos a los que se había inyectado subcutáneamente agua para aumentar su peso.

Por ser la digestiva la puerta de entrada de las infecciones hídricas los agentes además de su capacidad de pervivencia en el suelo y en el agua, deben resistir las condiciones del aparato digestivo especialmente el pH ácido gástrico. Los gérmenes del agua pueden salvar el pH ácido pues el agua circula desde el esófago al duodeno sin quedar en el estómago y además el agua diluye el jugo gástrico. La aquilia o los tratamientos alcalinos como los que se empleaban antiguamente para tratar las gastritis y la úlcera favorecen la infección por el *V. colérico*, por la *S. typhi* etc.

Las aguas envasadas suponen menos riesgo siempre que su captación y envasado se hayan efectuado correctamente. En caso contrario han provocado brotes. Es erróneo creer que las bebidas carbonatadas por su CO<sub>2</sub> y alto contenido de azúcar de algunas de ellas no tienen riesgo La transmisión hídrica puede producirse por la contaminación marina por vertidos fluviales o de alcantarillados o bien por agua usada como lastre y que se vierte en puertos para cargar a los barcos con mercancías. El cloruro sódico del mar no disminuye el riesgo. French e Hill (1970) vieron

aguas muy salinas del Golfo Pérsico contaminadas por varios miles de ovejitas importadas que se ahogaron. El agua del mar transmite gérmenes entre ellos el *V. parahaemolyticus* (la Y) 000. Por eso no pueden autorizarse vertidos al mar de efluentes con más de 5 *E. coli* por ml según expresan las normas para el vertido, proyecto y ejecución de instalaciones depuradoras y vertidos de aguas residuales al mar (aprobadas con carácter provisional en BOE de 20 de junio de 1969). La vigilancia del agua de mar debe hacerse tomando muestras a 5, 10 y 50 m de la orilla y a 25 m de profundidad

#### LA TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES HÍDRICAS POR PECES Y MOLUSCOS Z.

Los lamelibranquios bivalvos (Ostras, mejillones, berberechos etc.) desarrollados naturalmente o en viveros se contaminan con los microorganismos del agua de mar que retienen para nutrirse filtrando para ello entre 4 a 20 litros de agua a la hora. Los casos que aparecieron al final de la epidemia cólera de 1975 en Galicia se debieron al consumo de moluscos contaminados por los aportes del vibrión colérico de las aguas fluviales. Moreno y col. (1977) en 17 muestras de mejillones sin depurar procedentes de la ría de Arosa encontraron entre 0,13 y  $16,5 \times 10^4$  gérmenes por ml. El 24% de las muestras tenía menos de 10 coliformes por ml como NMP; el 35 % tenía 11 a 100; el 29 % entre 101 y 1000 y el 12% más de 1000. Los pescaditos crudos comidos en la propia playa causaron el brote de cólera de Málaga de 1978.

La epidemia de cólera surgida a finales de enero de 1991 en Perú se debió al consumo de peces y moluscos contaminados por el agua de lastre o de contenedores de un barco que había tocado puertos asiáticos y que fue vertida en puertos peruanos, comidos crudos o insuficientemente cocidos. Efectivamente el *V. cholerae* 01 fue aislado del agua de mar y de dos pescados (*Austromenidia regia*) capturados cerca de los desagües municipales en Chancay y en el sur de Lima. En abril de 1991 se produjo el contagio de varios residentes en New Jersey y poco después la de cuatro de Nueva York por carne de cangrejo transportada ilegalmente en una valija desde Ecuador. Igualmente una ensalada de langostinos servida en un vuelo de Buenos Aires a Los Angeles con escala en Lima en febrero

de 1992 causó el cólera a 97 de los 336 pasajeros y a 17 de los 20 tripulantes.

## LA TRANSMISIÓN POR EL AGUA USADA PARA BAÑOS

Más raramente se puede producir la transmisión al bañarse en agua de mar o dulce. Aunque, no haya nadado y sin que aparentemente no SE haya tragado agua, entra en el bañista casi sistemáticamente por nariz y por boca 10 a 50 ml de agua, pero debido a la baja concentración de patógenos por la dilución es raro que entre la dosis infectante incluso en aguas muy contaminadas. (salvo que al bañarse hayan consumido moluscos encontrados en la arena. Hay que tener en cuenta que al bañarse se remueve el sedimento. En 1958 se produjo un brote de tifoidea en Perth (Australia); el caso inicial fue un niño de 12 años que estuvo nadando en la playa y luego aparecieron otros 15 casos de los que 10 se habían bañado en la misma playa. Se aislaron en los enfermos 10 cepas de 5 fagotipos lo que indica probable contaminación fecal ya que los casos provocados por portadores suelen pertenecer a un mismo fagotipo; sin embargo no se logró aislar la *S typhi* ni de las aguas residuales ni en la del mar. No obstante no deben utilizarse para el baño agua contaminadas. En las piscinas se transmiten Chlamidias productoras de conjuntivitis y adenovirus, las amebas de vida libre (ls amebas *Limax* pueden albergar bacterias entéricas Jadin 1978). Son saprofitas las del género *Vanella* Las *Vanella Mira* y *platypodia* son las mas frecuentes en piscinas (Bovee 1965), incluso en las de servicios de rehabilitación, en los refrigeradores, en agua para enjuagar la boca en odontología,. Ariza y cols. (1989) encuentran las especies *simplex*, *platypodia*, *mira* y *miroides* en agua dulce que pueden causar encefalitis. En los baños el agente entra por vía oral pero hay casos en los que penetra activamente como pasa con las leptospiras del agua contaminada por la orina de diversos animales como ratas, ratones, bóvidos, (cada ml de orina puede contener 100 millones de leptospiras) équidos, suidos etc. Si el ph no es ácido, las leptospiras persisten semanas en el agua. El germen entra por mucosas entre ellas la conjuntival, la respiratoria y la digestiva si se bebe el agua pero especialmente a través de la piel con mínimas soluciones de continuidad (heridas, excoriaciones) o por la simple maceración causada por el agua. La infección se puede pro-

ducir por contacto con aguas residuales (empleados en la limpieza de alcantarillas), con agua de ríos o canales (pescadores, excursionistas, empleados en la limpieza de canales o acequias), o terrenos encharcados (trabajadores del campo, empleados en mataderos, mineros, poceros etc.). En Veluwe (Holanda) se presentaron tres casos por contaminación a partir de las aguas residuales. El agua de piscinas, balnearios etc. puede servir de vehículo de micosis como el Pié de atleta en los bañistas.

La *Acanthamoeba* spp. puede causar queratitis con infiltración, ulceración, opacificación e hipopión con intenso dolor y para cuyo tratamiento se requiere instilar durante cuatro semanas colirios a base de derivados de propamidina, imidazoles, hexamidina, aminoglucósidos y polimixinas. Jones y cols. (1995) describieron el primer caso originado por el lavado con agua de un río, de un ojo lesionado debido a la *A. polyphaga* y uveitis con meningoencefalitis letal; desde entonces se han publicado algunos otros casos especialmente en portadores de lentes de contacto entre ellas una acaecida en dos pacientes canarios en los que en el raspado de sus lesiones y en el agua en la que se conservaban las lenti-llas Miguel y cols.(199) encontraron trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba*, además de *Proteus mirabilis* en uno y de *E coli* en otro.

La Guía para la “Elaboración de normas respecto al Medio en Atención Primaria de Salud” clasificó las aguas costeras respecto al baño según el número de *E.coli* contenidas en 100 ml como : 1º Aptas. Si tienen menos de 100, 2º Tolerables las que contienen entre 100 y 1.000 y 3º Nocivas las que tienen más de 1.000. En cada zona de baño se analizarán, además de los coliformes fecales, los estreptococos fecales y clostridios sulfito-reductores para confirmar el origen de la contaminación fecal (remota o próxima). debiendo tener por litro menos de 10 mg de materia orgánica 0,5 mg de amoníaco, de 0,5 de nitritos, 100 de nitratos. Los análisis deben efectuarse según los métodos oficiales de análisis microbiológico dispuestos en la Orden de 27 de julio de 1983 del Ministerio de Sanidad.

## LA TRANSMISIÓN DE PROCESOS POR AEROSOLES DE AGUA

Otro mecanismo de transmisión relacionado con el agua es la inhalación de aerosoles de agua contaminada con virus o con legionellas.

Los aerosoles de 0,2 a 2 micras pueden contener hasta 100 bacterias, llegar a los alvéolos (los mayores se quedan atrapadas en el moco de las vías respiratorias superiores) atravesando su pared. El agua especialmente las negras sobre todo en las estaciones depuradoras al inyectar aire, desprenden burbujas de gases a cuya cubierta líquida se adhieren partículas conteniendo microorganismos que se concentran en ellas mas de 100 veces. También el viento arranca de las superficies hídricas, aerosoles que pueden vehicular microorganismos. El riego por aspersión transforma entre el 0,1 al 1 % del agua según el aparato, la presión y la velocidad, en aerosoles que pueden ser transportados por el viento a mas de 2000 metros (Parker y cols. 1977 las encuentra a 25 km.). Estos aerosoles pueden infectar al hombre por vía respiratoria y como los casos quedan dispersos no se suele atribuir al agua el origen del cuadro. Los enterovirus se pueden transmitir por este mecanismo. Katznelson y cols.(1976) vieron en Israel que los habitantes de viviendas cercanas a plantas de tratamiento de aguas residuales que regaban por aspersión con el efluente de los estanques de oxidación tenían 2 a 4 veces más tifoidea, salmonellosis, shigellosis y hepatitis que los controles. El mecanismo habitual de transmisión de la Legionella pneumophilla y de las otras legionellas, es por aerosoles de agua que contienen legionellas que se habían desarrollado en acondicionadores de aire, griferías y alcachofas de duchas. Los humidificadores de aire también pueden contaminarse con actinomicetos, hongos que producen anticuerpos precipitantes. Se ha encontrado Naegleria gruberi en reservorios de agua y en el polvo de una fabrica de rayón causando alveolitis alérgica extrínseca.

Los taladros de alta velocidad y otros aparatos odontológicos a base de ultrasonidos puede producir aerosoles contaminados por el agua suministrada aunque esté clorada pues puede haber muy poco cloro en el grifo.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ENFERMEDADES HÍDRICAS.

1° Los brotes y epidemias hídricas afectan solo o de modo predominante a los consumidores del agua contaminada por lo que tienen una distribución geográfica determinada..

2° Clásicamente las enfermedades hídricas afectaban a muchas personas en un corto tiempo (holomiánticas) ya que si se contamina un abastecimiento se infectarán todos los que beben ese agua produciendo un brote o epidemia holomiántica, característica clásica de las enfermedades transmitidas por el agua. En el caso de una contaminación única cuando ha transcurrido el periodo de incubación mínimo empiezan a aparecer casos que aumentan a medida que se llega al periodo de incubación medio. Por ej. en el caso de la tifoidea empiezan a aparecer casos a los 9 a 15 días con máximo a los 24 a 30 días; se mantiene el número más o menos constante unos cuantos días, para ir descendiendo más lentamente. Si la contaminación es continua la evolución de la epidemia es menos escarpada. Una gran inclinación de la gráfica de los casos incidentes implica una única fuente, mientras que si hay varias, la línea es mas tendida. Cada vez son menos probables las epidemias holomiánticas pues actualmente el agua contiene pocas bacterias y desde luego virus de modo que la dosis infectante la reciben muy pocas personas y de estas no hay muchos susceptibles de modo que los casos son esporádicos. La Dosis infecciosa en teoría es un solo microorganismo viable, pero hay que aumentar este número supere las barreras defensivas del operador, de modo que una dosis infectante de un solo germen, la tienen muy pocos microorganismos, como los enterovirus, mientras que la mayoría tienen un  $DICT_{50}$  entre 10 a 10.000 y varios miles en el caso de las bacterias.

Una vez inicia una epidemia, brote o incluso un solo caso transmitido por el agua, pueden seguir apareciendo casos, algunos prosodemícamente, por contagio desde los enfermos o desde los portadores que se han ido produciendo llegando a hacer irreconocible el origen hídrico de la misma. Los agentes causales no siempre se transmiten por el

agua y los que se excretan por las heces se pueden transmitir por las manos sucias causando enfermedades prosodémicas que se extienden en mancha de aceite o contaminando alimentos.

3° A menudo se aísla el agente en el agua de abastecimiento . Sin embargo a veces ha desaparecido cuando se toman las muestras. Tampoco basta la presencia de un microorganismo como una *salmonella*, una *shigella* o una *E. coli* en un agua para achacar a este la etiología del brote o epidemia ni al agua su transmisión. Incluso a menudo la contaminación se debe a los casos infectados por otros mecanismos.

4° La supresión de la fuente o la depuración del agua suprime o al menos disminuye la incidencia

5° Las bacterianas suelen presentarse mas en verano, pues aunque el frío conserva a los gérmenes, el calor suministra mejores condiciones para multiplicarse

6° Hay pocas diferencias en cuanto a edad, sexo y condición social, laboral etc. de los afectados respecto a los no afectados. Si influye la cantidad de agua bebida

7° Los gastrectomizados, o los que toman alcalinos son mas susceptibles a las infecciones bacterianas hídricas como el cólera. El agua favorece el tránsito por la calle gástrica sin apenas contactar con el jugo gástrico.

8° Los agentes, especialmente los virus determinan más infecciones inaparentes que casos clínicos

9° Las bacterianas y las víricas producen inmunidad absoluta como la hepatitis A o relativa como la tifoidea, de modo que los inmigrantes a zonas endémicas sufren mas la enfermedad que los indígenas.

10° La transmisión de las enfermedades hídricas es en la mayor parte de los casos antropogénica, teniendo por ello un papel importantísimo la conducta humana. Más que un problema médico lo es de educación de las personas y de las autoridades sanitarias y políticas.

Aunque, en general, cualquier bacteria patógena puede llegar al agua y propagarse por este medio, en la práctica esta posibilidad se limita a un corto número de gérmenes que, al eliminarse por las heces u orina de los enfermos o portadores, tienen mayores probabilidades de llegar a las aguas en cantidad suficiente para producir enfermedades que pueden manifestarse en forma epidémica.

**TIFOIDEA.** La tifoidea, con el cólera, es la enfermedad hídrica por antonomasia. Whipple atribuyó en 1908 al agua el 40 % de los casos de tifoidea y a finales del XIX la mortalidad por tifoidea en las grandes ciudades superaba al 0,5 por 100 pero cada vez hay menos epidemias hídricas de tifoidea debido a la vigilancia de los abastecimientos de modo que prácticamente solo se producen brotes en los pueblos en donde la cloración se efectúa mal. La *S. typhi* pervive en el agua un tiempo variable según el clima, las condiciones del agua especialmente la concurrencia bacteriana y la técnica empleada. En 1847 se atribuyó al agua un brote de tifoidea en la ciudad Suiza de Llauren. En Lausane en 1872 se produjo una importante epidemia hídrica de tifoidea. Desde octubre de 1914 hasta principios de 1915 se produjo otra en Barcelona entonces con 600.000 habitantes que causó 7.507 casos con casi 2,300 defunciones por contaminación de las aguas de Moncada procedentes de galerías filtrantes de los ríos Besós y Ripoll. En Málaga se dio otra epidemia de tifoidea en 1951 por contaminación con aguas residuales y otra en Madrid en 1959 con 1.600 casos. Un portador urinario que trabajaba en el depósito de agua de Croydon ocasionó en 1937, una epidemia con 3.100 casos y 43 defunciones. En las 80 ciudades más populosas de USA la incidencia de tifoidea en 1903 fue de 700 por 10<sup>5</sup> habitantes En 1910 cuando ya se habían instalado filtros no superaron los 100 y poco después con la cloración bajó a 22 casos en 1920 y en 1935 con la adopción de otras medidas como el control de los portadores la incidencia fue mínima.

En Caluso, cerca de Turín se hospitalizaron en diciembre de 1984 unas 800 personas con fuertes dolores abdominales, vómitos y diarreas por haberse contaminado el pozo que servía a la ciudad por la rotura accidental de una conducción por las obras para instalar una tubería de gas.

**GASTROENTERITIS** El agua origina anualmente unos 900 millones de casos de gastroenteritis que matan a 3 millones de personas. En 1975 se produjo un brote de gastroenteritis por agua en Sewickley (Pennsilvania) con 5.000 casos. En agosto de 1979 la avería del clorómetro ocasionó en Azpeitia (Guipúzcoa) un brote de gastroenteritis que afectó al menos a 70 escolares..En los primeros días de octubre de 1982 se produjo en Urnieta (Guipúzcoa) una epidemia de gastroenteritis con intensa diarrea, fiebre y vómitos que afectó a unos cincuenta adultos y a seiscientos niños

de los que hubo que hospitalizar a 15 debido a la contaminación del agua de bebida al parecer por algún afectado de Andoain localidad en la que pocos días antes se habían dado dos brotes en los trabajadores que habían comido en los comedores de dos fábricas coincidiendo con una avería en el sistema de cloración por una tromba de agua que cayó el día 5.

A menudo se achaca al agua el origen de toxiinfecciones en las que se ignora el mecanismo de transmisión pero no cabe duda que el agua puede constituir el mecanismo de transmisión de gastroenteritis.

Los agentes causales pueden ser *salmonellas* no *typhi* que ocasionalmente pueden ser vehiculadas por el agua al contaminarse por las excretas de los animales de abasto o por las aves. Aunque en el agua perviven entre varias semanas a tres meses no suelen alcanzar la dosis infectante y por ello el mecanismo habitual es a través de los alimentos en donde se pueden multiplicar. En 1965 en Riverside (California) se infectaron con la *S. typhimurium* 16.000 personas de un total de 133.000 que afectó especialmente a los niños más sensibles porque tienen menor DI. La epidemia nueve días antes debido a un corte de suministro para hacer una nueva conexión y durante 42 horas se estuvo utilizando agua de pozos en los que se aisló el germen. Rose y cols (1966) dedujeron que bastaban unos pocos gérmenes para causar el cuadro. Molinero y cols (1998) estudiaron la gastroenteritis producida por la *Salmonella* ohio que causó un brote en 59 escolares que hicieron un excursión a Villabuena (Alava) pueblo de 363 habitantes siendo la tasa de ataque en los que bebieron agua de la fuente de 67,8%. García Villanova y cols. (1986) analizaron 181 muestras de agua de riego de la vega de Granada encontrando como media en 100 ml Bacterias aerobias  $3,1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$  como NMP de coliformes totales,  $5,1 \times 10^6$  NMP de E. Coli,  $8,9 \times 10^5$  de estreptococos fecales y  $2,7 \times 10^4$  de clostridios encontrando 31 tipos diferentes de *Salmonellas* no *typhi*. La *E. coli* enterotóxica, importante en la patogenia de la diarrea del viajero puede transmitirse por el agua. Palmer y cols en 1983 describieron un brote que persistió ocho semanas, de gastroenteritis por *campilobacter* que afectó a 234 alumnos y a 23 empleados de un internado debido al agua de un depósito en la que se encontró el bacilo) etc. y el *C. jejuni* causó en Vermont una epidemia hídrica que causó, según la CDC, cerca de 3.000 casos de gastroenteritis en 1978. También es posible la transmisión por el agua de la *Yersinia* enterocolitica y de las aeromo-

nas. En las *shigellosis* el contagio se establece fundamentalmente por las manos sucias, mientras que la transmisión por el agua tiene muy poca importancia aunque las shigellas resisten mucho en ese medio (Vincent encontró que la *Sh shigae* persistía 14 días en agua destilada) El propio Shiga observó una epidemia holomiantica en Japón. La transmisión hídrica de las *shigerllosis* es un epifenomeno de la transmisión por contacto directo. En septiembre de 1978 se produjeron 150 casos de disenteria clínica por *Sh. sonnei* en Puentedeume en cuya agua se encontró el germen. La deficiencia de agua potable dificulta la profilaxis, pues es el medio más importante para eliminar el material infeccioso (lavado de manos, utensilios, alejamiento de excretas, etc.)

Las leptospiras se pueden transmitir por el agua. En Veluwe (Holanda) se presentaron tres casos por contaminación a partir de las aguas residuales. La *Lysteria monocytogenes* es una *sapronosis hodroté-lurica*. Ocasionalmente el agua puede transmitir el tétanos. La *P. tularensis* contamina a partir roedores, castores, ratas almizcleras al agua; parece que el germen se puede reproducir en el barro y materia orgánica de las orillas. La *P. Turalensis* ha ocasionado según Jellison y cols (1942, 1950) casos de tularemia en los que bebieron ese agua. Se ha sugerido la transmisión por el agua del *Helicobacter pylori*.

El agua puede contener los resistentes bacilos de Koch a la que llega procedente de los esputos y en algún caso de las heces. Se le encuentra en las aguas residuales, especialmente en las proximidades de hospitales y sanatorios, donde la contaminación puede llegar a ser elevada. Coin y cols. (1964) lo aislaron en el 30 % de muestras de agua residual en las proximidades de sanatorios,. Se han descrito raros casos humanos de tuberculosis causada por el *M. bovis* el cual se ha encontrado en agua estancada contaminada por ganado enfermo. También puede el agua jugar algún papel en la infección por mycobacterias atípicas entre ellas el *B. marinum*. Andreu y cols (1983) encontraron *M. gordonae*, *chelonei*, *scrofulaceum* en aguas residuales que concentran por Millipore y siembran en medio líquido También se ha aislado del agua el *M. kansasii*. Fischeder y cols. (1991) encontraron que el 80 % de 33 muestras de agua procedente de depuradoras y en el 72% de la del grifo tenían entre  $10^2$  a  $10^3$  unidades formadoras de colonias por litro. La identificación de las especies por bioquímica y por cromatografía en capa fina demostró que

se trataba de *Myco. fortuitum* en la depuradora y de *M. gordonae*, *chelonae*, *flavescens* y *kansasii* en el agua del grifo. Cuando la concentración es baja no parece que supongan riesgo para la salud; solo tal vez en los trabajadores de depuradoras que manejan cienos.

Las conducciones de agua (y los sistemas de refrigeración) son el hábitat adecuado para el desarrollo y diseminación de la *Legionella pneumophila*. El germen se encuentra en agua de ríos y lagos sin causar brotes Hierro y cols (1985). lo encontraron en aguas de Cantabria en el verano de 1984 a 20-30 cm de profundidad. En el agua resiste entre 3 y 12 meses y a veces mas. Se ha señalado que podrían albergarse en las Naeglerias y reproducirse en ellas. Sin embargo en el agua natural no encuentran las legionellas condiciones adecuadas para reproducirse y por ellos los brotes se asocian a sistemas artificiales de conducción de agua

VIRUS Z. Hay más de 129 tipos de virus entéricos es decir que se multiplican en el tubo digestivo y se eliminan con las heces que contienen por g una  $200 \times 10^6$  UFP. Entre ellos tenemos a componentes de las familias *Picornaviridae* (Polio I,II III, *Coxsackie* A y B, virus ECHO) *Rheoviridae* (*Rheovirus* I a 3, *Rotavirus* 1 a 3), *Coronaviridae* (Coronavirus), *Calicivirus* y *Astrovirus* humanos y animales, *Parvoviridae* (Parvivurus Agentes Norwalk posibles parvovirus), *Adenoviridae* (Mastadenovirus y los Adenovirus humanos 1 al 35) siendo los mas importantes los agentes de la poliomielitis.y los de las hepatitis A y E. Los enterovirus se eliminan por el tubo digestivo y menos veces por el tracto respiratorio del hombre, desde donde pueden llegar al agua. La cantidad de virus del agua depende de la prevalencia de infectados, del grado de saneamiento ambiental del nivel educativo y socioeconómico de la población, y de las condiciones ambientales (clima, pluviosidad, características del terreno etc.)

Por ello los enterovirus especialmente los virus de la poliomielitis, *Coxsackie* y *Echo* se encuentren constantemente en las aguas residuales Berg (1971) encuentra en USA, durante los meses fríos en aguas superficiales concentraciones por litro de 30 a 100 upf por litro, mientras que contiene 5 a  $500 \times 10^5$  coliformes y en las utilizadas para bebida una concentración media por litro de 100 ufp. (Berg 1984). Hay que tener en cuenta que las técnicas de detección de virus en el agua son poco sensibles de

modo que la cantidad real de virus del agua es superior a la que se puede demostrar por los métodos actuales. La cantidad varía según la población y la época del año. En Israel, Shuval (1970) encuentra por término medio de 500 a 600 unidades víricas (PFU) por litro de agua, correspondiendo los resultados más elevados a las poblaciones con condiciones económico-sociales deficitarias. Los virus se adhieren mucho a las partículas sólidas del agua soslayando así los efectos del cloro (Stagg y cols 1978) Pueden entrar en el organismo con el agua a través de faringe ; atraviesan sin pérdida el estomago pues resisten el pH ácido y entran en las células intestinales en donde se multiplican habiéndose encontrado por g de heces mas de  $10^6$  viriones durante muchos días.

Los virus necesitan células vivas para multiplicarse y no se ha encontrado ningún virus humano que lo haga en las células de los organismos acuáticos por lo que el agua es desfavorable para su persistencia aunque pueden persistir lapsos variables según su estructura, y las características de las aguas como temperatura, pH y contaminación bacteriana concomitante. Los virus no son atacados por fagos ni por las *mixobacterias* aunque hay bacterias marinas que los destruyen.

Rao y col. (1984)encontraron estos resultados

	Tipo de producto	Número	Porcentaje de positivos	ufp por litro
Enterovirus	Agua	35	14	3 a 12
	Sedimento compacto	35	6	7 a 10
	Sedimento superficial	15	47	39 a 398
	Partículas sólidas suspendidas	18	72	4 a 40
Rotavirus	Agua	31	16	119 a 1.000
	Sedimento compacto	6	12	1.200
	Sedimento superficial	15	40	800 a 3.800
	Partículas solidas suspendidas	18	50	1800 a 4980

Ribas y cols. (1983) estudiaron en 12 muestras del Llobregat la presencia de enterovirus en 1982

Estación	Concentración media de enterovirus	Desviación típica
----------	------------------------------------	-------------------

Invierno	0,9	1,8
Primavera	4,8	11,6
Verano	0,6 (mínimo en julio)	1,3
Otoño	11,9 (máximo en noviembre)	14,6

Las diferencias estacionales representan más que la pervivencia de los enterovirus los aportes de los mismos al río. Los enterovirus persisten entre 2 y 168 días en aguas corriente, 2.130 en la del mar (25 a 125 días en el suelo y más de 90 en ostras)

Los virus entéricos son muy susceptibles al calor a la desecación y a los UV pero resisten al éter, al cloroformo, a la bilis, al bajo pH es decir el jugo gástrico. Los virus son más resistentes a la autodepuración natural y a los sistemas artificiales que las bacterias. Por ej. el virus de la hepatitis A resiste el contacto con 23 ppm de cloro durante 30 minutos (Neefe y cols. 1945). En 1947, Neefe y cols. observaron que el virus de la hepatitis A se podía inactivar en el agua por la presencia de 0,4 p.p.m. de cloro libre, a condición de que el agua hubiera sido sometida previamente a métodos de depuración física poco eficaces para eliminar el virus pero si para desembarazar al agua de sedimentos con virus y de materia orgánica que protege a los virus del cloro..

El papel del agua en la transmisión depende de la capacidad infectiva del virus. Katz y Plotkin (1967) demostraron que la dosis mínima infectiva de los enterovirus por vía oral para al hombre se corresponde con la más pequeña cantidad de virus que puede ser detectada por cultivo en las células sensibles

Pese a la gran dilución que sufre el agua residual en su vertido a los ríos, es posible detectar virus más abajo de los puntos de vertido, habiéndose aislado del 38,2 % de muestras del río Illinois (Lamb, 1964), en el 24 % de las del Sena (Coin, 1964), en el 9,1 % de las del Meurthe (Foliguet, 1966), en el 26,2 % de las del Ruhr (Primavesi, 1966), en el 46 % de las del Támesis (Poynter, 1968). Pero además se han aislado virus de lugares muy alejados; Berg en el Missisipi, encontró en un litro entre 60 a 50.000 coliformes mientras que contenía 1 a 19 unidades víricas, sin que hubiera relación entre las concentraciones de los virus y las de las bacterias de modo que había más virus en las aguas que tenían menos gérmenes. En Madrid, Cabo (1970) aísla enterovirus en el río Jarama a 44

kilómetros de la última contaminación importante. Ribas y cols (1983) concentran los enterovirus en un aparato que contiene polvo de vidrio del cual los eluyen después y cuantifican por cultivo en células BGM.. Ya la Reunión de la OMS y de la *American Public Health Association* celebrada en México en 1974 estableció como límite aceptable provisional una unidad infecciosa de viriones por 37,85 l de agua para fines deportivos y menos de una en 378,5 para agua de bebida

La poliomiélitis se transmite fundamentalmente por contagio interpersonal pero el agua sigue teniendo una gran importancia. En 1929 Kling, director del Instituto Nacional de Bacteriología de Estocolmo, con sus colaboradores emitieron la teoría de que el agua era el origen de todas las epidemias de poliomiélitis, pero no se han podido objetivar muchas epidemias hídricas. Entre ellas tenemos la de Edmonton (Canadá) en 1954 y la de Huskerville (U.S.A.) en 1957. En España se produjo en 1969 un brote en Tarrasa con 19 casos y cuatro defunciones, por la contaminación de una terminal del abastecimiento de aguas, producida por succión de aguas residuales durante un corte en el suministro por avería. Nosotros observamos en 1948 una sucesión de casos clínicos que iban apareciendo secuencialmente en el tiempo y en los pueblos por los que pasa el Segura.

Los ECHO, *Coxsackie*, rotavirus, los agentes tipo Norwalk, Denver, Hawai etc. pueden producir diarreas agudas epidémicas. Knocke (1966) aisló reovirus en el 34 % de 382 muestras de agua probablemente contaminadas por las aguas residuales de mataderos, ya que los animales de abasto se encuentran muchas veces infectados por reovirus. Malherbe (1965) aisló reovirus (además de enterovirus y adenovirus) de las aguas residuales del matadero municipal de Johannesburgo

Las hepatitis A y E se pueden transmitir por el agua.. La epidemia más importante fue por el virus E (largo tiempo tenida como causada por el virus A) en 1955 en Nueva Dehli, donde, a consecuencia de lluvias torrenciales y de las inundaciones subsiguientes, se contaminó el abastecimiento de aguas de la ciudad, A pesar de la cloración del agua, se declararon en un mes 28.745 casos de hepatitis (Chuttani y cols., 1966).

En la provincia de Barcelona se presentaron en 1965 dos brotes de hepatitis en las localidades de Calaf, con más de 100 casos, y Prats del Rey, con 30, producidos por consumo de agua a partir de pozos contaminados. siendo el virus de las hepatitis A y E los que presentan una mayor

capacidad de resistencia frente a los agentes ambientales y desinfectantes, como el cloro.

Las normas EEC (1977) indican que no debe aislarse ningún virus patógeno en 10 litros de agua y algunos exigen que debe aumentarse a 500 y hasta 1000 l. Para la vigilancia de los virus en el agua deben concentrarse los existentes en grandes volúmenes de agua ultrafiltración sobre filtros solubles, por circulación tangencial continua, osmótica o bajo presión, por precipitación de los virus con óxido férrico o con hidróxido aluminico, por adsorción en membranas de celulosa -en gasas cortadas o plegadas de formas diversas sumergidas 24 a 48 horas que luego se exprimen-, de nitrato, de fibra de vidrio-resina epoxi lograda bajando el pH y aumentando la salinidad seguida de elución en un volumen pequeño de líquido subiendo el pH y diluyendo la salinidad; algunos solutos pueden disminuir la adsorción y puede haber interferencias en la elución. La electroforesis forzada permite que los virus se absorban selectivamente sobre membranas de diálisis semipermeables o pasar por membranas de ósmosis. El recuento se hace determinando la última dilución que es positiva, por el número mas probable o por el número de unidades formadoras de placas.

## PROTOZOOS

En el agua se encuentran quistes de amebas que pueden infectar al hombre. En 1933 se produjo un brote en Chicago debido a un fallo de las conducciones que causó mas de 1.000 casos con 58 defunciones. Afecta a países templados aunque mucho mas en los tropicales probablemente por la mala higiene mas que por las condiciones climáticas. Chandler en 1955 describió una epidemia en el puerto de Murmansk en la península de Kola mas al N del círculo polar ártico que afectó al 60 % habitantes. Los quistes de amebas resisten mucho al cloro de modo que en las zonas afectadas la depuración física debe hacerse con criterios muy exigentes y utilizar en abastecimientos pequeños desinfectantes químicos como el yodo. Diversas especies de *Naeglerias*, *Hartmanellas* y *Acanthamoeba* de colecciones de agua como embalses, pantanos, aguas residuales etc. piscinas, pues son de vida libre, producen infecciones.

Se han descrito numerosas epidemias hídricas por giardias. En 1954 se produjo una epidemia en Portland que causó 50.000 casos clínicos. Brown estudió una en Colorado en 1968 debida a una conexión entre el alcantarillado y el agua de abastecimiento. Entre 1971 y 1979 se señalaron en USA 31 brotes con más de 17.000 casos clínicos. En Roma en el Estado de Nueva York se produjo en 1974 un brote con 4.800 casos de giardiasis. Craun (1979), Wolfe (1979), Meyer y col. (1980) etc. comunican casos semejantes. La giardia puede proceder de animales y como sus quistes pueden persistir mucho tiempo en el agua, puede ser este un mecanismo importante de diseminación. Hay que recordar que los quistes son muy resistentes al cloro.

Los quistes de toxoplasmas eliminados por las heces de los felinos pueden contaminar el agua y pasar al hombre. La criptosporidiosis es una zoonosis cuya incidencia humana aumenta debido a los cambios tecnológicos en granjas, en la alimentación y en la higiene de los animales y con la estabulación masiva. Se puede transmitir por contagio directo con excretas animales, por alimentos pero también por el agua. La contaminación de origen animal lleva al agua quistes de criptosporidios. Afecta a personas normales pero los inmunodeficientes sufren cuadros más graves y con importantes complicaciones. En febrero de 1989 se produjo un brote de criptosporidiosis de origen hídrico en Oxfordshire-Swindon por agua depurada (Dick 1989). Hayes y cols. (1989) describieron un brote importante por agua depurada por floculación y cloración en Carrllonton (Georgia); aunque solo se halló el parásito en heces de 58 afectados se calcula que hubo unos 13.000 afectados por la encuesta telefónica, de los que 147 debieron ser hospitalizados. El brote se produjo en enero y febrero de 1987 aunque es más frecuente en primavera. D'Antonio y cols. (1985) vieron un brote en Texas por agua que había recibido aguas residuales. Smih y cl. (1988) otro en Scotland por agua que recibió efluentes de agua superficial. Afecta a los que bebieron agua y a todas las edades. La latencia entre la ingesta de agua y la diarrea es de 3 a 7 días.

La Cyclospora es un protozoo parásito. En Nepal es endémico causando diarreas entre mayo y octubre.. El 7 % de los procedentes de ese país tienen cyclospora en sus heces. En junio de 1994 enfermaron con diarrea persistente 12 de 14 soldados ingleses y personal relacionado con

ellos, estacionados en un pequeño destacamento militar en Pokhara (Nepal). Se encontró la ciclospora en las heces del 75 % de los afectados. El agua era mezcla de la del río y del abastecimiento local que se filtraba, aunque no daba garantías de que retuviera las ciclosporas pues el agua seguía conteniendo coccidios que miden 8 a 10 micras. según vieron Rabold y cols. (1994) por filtración en Millipore aunque fue negativa la investigación de coliformes. Se cloró dejando 0,3 a 0,8 ppm de cloro residual. El parásito es muy resistente al cloro

En 1990 se produce un brote de ciclosporas en personal médico de un hospital de Chicago causado por el agua de bebida según el estudio epidemiológico aunque no se encontró el parásito en el agua incriminada (Ortega y cols.1993). También pueden transmitirse por el agua coccidios y balantidios.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANDREU U, MARTIN N, GONZALEZ F Y COLS. Gaseta Sanitaria 2, 103, 1983
- (2) ARIZA C,GUEVARA DC, UBEDA JM, CUTILLAS C. Description of four species of the genus *Vannella* isolated from feshwater. *Microbiologia Sem* 5.25,1989
- (3) APHA (1972): Standard methods for the examinations of ciairy products, 13th edition, pp. 88-99. The American Public Health Association, Washington.
- BARNFS, E. M. (1956): «Methods for isolation of faecal streptococci (Landcefield group D) from bacon factories», *J. Appl. Bacteriol.* 19, 193-201.
- (4) BARTLEY CH, SLANETZ LW. (1960): «Types of sanitary significance of faecal streptococci isolated from faeces, sewage and water». *Amer. J. Publ. Hlth.* 50, 1545-1552.
- (5) BEJ AK, MAHBUBANI MH, MILLER JL, Y COLS. Muktiplés PCR amplification and immobilized capture probesd for detection of bacterial pathogens and indicators in water .*Mol Cell Probes.* 4, 353, 1990
- (6) BERG C. *Monographs in virology.* 15,17,1984
- (7) BOWEE EC. An emendation of the ameba genus *Flabellula* . *Trans.Am.Micros. soc.* 84,217,1965
- (8) BROWN LR. La situación en el Mundo. De. Apóstrofe. 1993
- (9) Cairns, J. Jr., y Pratt, J. R.: *The scientific basis of bioassays, Hydrobiologia,* 188/189, 5, 1989.
- (10) BUCHANAN RE,GIBBONS NE. (ed.) (1974): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,* 8<sup>th</sup> edition The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- (11) CHANDLER JR AC.*Introduction to Parasitology.* New York 1955
- (12) CHANDLER JR. A biological approach to water quality management *Wat Pol-lut.Cont* 69,415,1970

- (13) COMBARRO MP, LONMGO E, AGRELO D Y COLS. Contaminación bacteriana en pozos de zona rural de Galicia. *Rev San Hig Pub.* 62,1561,1988
- (14) DE MIGUEL I, FERRANDO R, SANTAÁN E, MARTÍN M. AM. Queratitis producida por *Acanthamoeba* en pacientes portadores de lentes de contacto. *Enferm infecc Microbiol Clin.* 17, 445-448,1999
- (15) D'ANTONIO RG, WINN RB, TAYLOR JP Y COLS. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Amer Intern Med.* 103,886,1985
- (16) DICK TA. Report of an inquiry into water supplies following an outbreak for cryptosporidiosis during February 1989. *Reading Water Authority.* 1989
- (17) ESPIGARES GARCÍA M., Y PÉREZ LÓPEZ, J. A.: Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Universidad de Granada, Granada, 1985
- (18) FRENCH GE, HILLAG .KUWAIT. A Geomedical Study. Ed Stringer. Berlin 1970
- (19) GARCÍA VILANOVA B, MARISCAL A. CUETO A. Estudio comparativo de diversos indicadores de contaminación biológica en aguas de riego. *Rev San Hig Pub.* Sesenta, 11 sesenta y 1, 1986
- (20) GERBA CP Y COLS. *Marine pollution bulletin.* 8,179,1977
- (21) GESTAL JJ. Contaminación marina y salud. Libro de Conferencias de la Caixa de Pontevedra. 1995
- (22) GOLDMAN CR, HORNE HJ. *LIMNOLOGY.* DE. Mc Graw-Hill NY. 1983.
- (23) GONZALEZ DEL TAMARGO M, GARCÍA DE JALÓN D, MARTINEZ El caso I. Algunos índices biológicos en ríos españoles. *Técnicas Instrumentales Tratamiento Medio Ambiente.* 1,num 4,1979
- (24) HAYES EB, MATTE TD, OFFEREIN TR Y COLS. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public weater supply. *New Eng j. Med.* 320,1372,1989
- (25) JADIN JB. *Acanthamoeba* vectors in pathogen bacteriae. *Acanthamoeba Conference.* Ohio 1978
- (26) JONES DB, VIVESBARA GS, ROBINSON NM. *Acanthamoeba* poliphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis *Trans Ophthalmolog Soc UK.* 95,221-232,1995
- (27) LAEKIN EP, LISTKY W, FULIER JE. (1955b): «Fecal streptococci in frozen foods. III. Effect of freezing storage on *E. coli*, *Str. faecalis* and *Str. liquaefaciens* inoculated into orange concentrate», *Appl. Microbiol.* 3, 104-106.
- (28) LIMA MFF, MAGALHAES MHA, ROCHA RS, ANTUNES CMF. Water contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of *S. mansoni*, *Bull. OMS.* 65,57,199987
- (29) MALLMANN WL, LISTKY W. (1951): «Survival of selected enteric organisms in various types of soil». *Amer. J. Publ. Hlth.* 41, 38-44.
- (30) MARIÑO FERNÁNDEZ, M. G.: Las aguas costeras. jornadas sobre Evaluaciones de Impacto Ambiental. Granada, 1983.

- (31) MENDOZA, M., Y SEYDEL, J. K.: Application of bacterial growth kinetics to in vitro toxicity assessment of substituted phenols and anilines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 228, 1990.
- (32) MONZÓN C, GONZALEZ LAMA Z LOPEZ ORGE RH Salmonella en aguas residuales. *Rev Esp Microbiol Clin.* 1,299,1986
- (33) MORENO B, ESCACHO ME. Índices de contaminación de origen fecal en mejillones de la ría de Arosa. *Rev san Hig Pub.* 51,1129,1977
- (34) MOSSEL DA, INGRAM M. (1955): «The physiology of the microbial spoilage of foods». *J. Appl. Bacteriol.* 18, 233-268.
- (35) MUNDT JO. (1961): «Occurrence of enterococci in bud, blossom, and soil studies». *Appl. Microbiol.* 9, 541-544.
- (36) MUNDT JO, JOHNSON AH, KATCHIKIAN R. (1958): «Incidence and nature of enterococci on plant materials». *Food Res.* 23, 186-193.
- (37) MUNDT JO, JOHNSON AH. (1959): «Physiological properties of group D streptococci isolated from plants». *Food Res.* 24, 218-223.
- (38) NIVEN CF. (1963): «Microbial indexes of food quality: fecal streptococci», en *Microbial Quality of Foods*, L. W. Slanetz, et al., Editors, Academic Press, Nueva York, pp. 119-131.
- (39) ORLA S. (1919): *The lactic acid bacteria*, A. F. Host and Son, Copenhagen, Dinamarca.
- (40) OSTROLENK M, HUNTER AC. (1946): «The distribution of enteric streptococci». *J. Bacteriol.* 51, 735-741.
- (41) ORTEGA YR, STERLING CR, GILMAN RH. Y COLS. Cyclospora species ; a new protozoan pathogen of human. *New Eng J Med.* 228,1308,1993
- (42) OSTROLENK M, KRMAER N, CLEVERDON RC. (1947): «Comparative studies of enterococci and E. coli as indices of pollution». *J. Bacteriol.* 53, 197-203.
- (43) PACKER RA. (1943): «The use of sodium azide (NaN<sub>3</sub>) and crystal violet in a selective medium for streptococci on Erysipelothrix rhusiopathiae». *J. Bacteriol.* 46, 343-349.
- (44) RABOLD JG, HOGE CW, SHLIM DR, Y COLS. Cyclospora outbreak associated with chlorated drinking water. *Lancet* 344,1360,1994
- (45) RAO VC, MEINICK JL *Applied and Environ Microb.* 48,404,1984
- (46) SAIKI RK, SCHAT F, FALOONA KB. Y COLS. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350,1985
- (47) SABBAG J, SUTTER VL, FINEGOLD SM. (1971): «Comparaison of selective media for isolation of presumptive group D streptococci from human feces». *Appl. Microbiol.* 22 (6), 1008-1011.
- (48) SCHRAPER HA. *The trace elements and man*. De. Old Greenwich. 1975
- (49) SHERMAN JM. (1937): *The streptococci*. *Bact. Revs.* 1, 3-97.
- (50) SHERMAN JM, (1938): «The enterococci and related streptococci». *J. Bacteriol.* 35, 81-93.

- (51) SHIRAI HM, NISHIBUCHI T, RAMAMURTHY SK Y COLS. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol.* 19, 1517,1991
- (52) SMITH EM Y COLS. *Applied and environ Microbiol.* 48,404,1978
- (53) SMITH HV, GIRDWOOD RWA,PATERSON W Y COLS. Waterborne outbreak of cryptosporidiosis. *Lancet* 2,1484,1988
- (54) STAGG CH Y COLS. *Progress in water technology.* 10,381,1978
- (55) STOKER, H. S., Y SEAGER, S. L.: Química ambiental: contaminación del aire y del agua. Blume, Barcelona, 1981.
- (56) THATCHER FJ,CLARK, DS. (ed.) (1973): Análisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza.
- (57) TORANZOS GA, ALVAREZ AJ. Solid-phase polymerase chain reaction. *Canad J Microb.* 38,365,1992
- (58) VOUK VB, Parizek J. Acción favorable de los oligoelementos del agua sobre la salud *Cronica OMS* 32,414,1978
- (59) WOODIWISS FS. The biological system of stream classification used by the Trent River Board. *Chem and Ind.* 11,443,1964
- (60) ZOETMAN B. C.J., Y BRINKMANN F. J. J., Human intake of minerals from drinking water in the European Communities, En : Hardness of drinking water and public health, Proceedings of a Colloquium, Commission Eur. Communities, Luxemburgo, 1975, págs. 173-202.

# Plan de Saneamiento y depuración de aguas residuales de la Comunidad de Madrid

IGNACIO LÓPEZ-GALIACHO PERONA  
*Director General de Calidad Ambiental*

## 1.- EL RECURSO AGUA EN LA COMUNIDAD DE MADRID

El agua es en la Comunidad de Madrid un recurso crítico, pues no es fácil abastecer en cantidad y calidad adecuadas un territorio que, con menos de 8.000 km<sup>2</sup> concentra una población de cinco millones de habitantes, la plataforma de servicios terciarios más importante y desarrollada de España y la segunda zona metropolitana más industrializada del país. Tampoco es fácil proteger los ríos y su entorno del impacto producido por el vertido de esas aguas, una vez usadas.

La estructura de demanda de agua es radicalmente distinta a la media nacional. Así, mientras en Madrid el consumo urbano e industrial representa el 67% del consumo total y la agricultura sólo consume un 33%, a nivel nacional estos consumos representan respectivamente el 19% y el 81% del total.

Las aguas superficiales de la Comunidad drenan en su mayor parte por los afluentes y subafluentes del río Tajo, en dirección Norte-Sur. El río principal es, pues, el Tajo que bordea por el Sur el territorio y recibe a todos los demás ríos de la provincia que conforman una malla drenante en forma de “espina de pez”.

Los caudales naturales de todos estos ríos, así como la calidad de sus aguas quedan modificados por la singularidad de la demana. Así en el sistema hídrico de Madrid pueden distinguirse cinco zonas (Gráfico 1), clasificadas según el uso del medio hidrológico, homogéneas y claramente delimitadas:

1.- Una **Zona productora** de agua limpia, que ocupa el Norte y Noreste de la Comunidad, constituida por las cabeceras de los afluentes y subafluentes del río Tajo, en donde se capta y almacena el agua.

2.- Una **Zona de cursos medios** cuyos caudales circulantes son muy reducidos por ser captados aguas arriba y con un poder de autodepuración mínimo.

3.- Una **zona consumidora**, formada por la capital y los municipios del Área Metropolitana, donde se utiliza masivamente el recurso y se devuelve al sistema deteriorado.

4.- Una **zona receptora**, situada aguas abajo del foco consumidor, que sufre los vertidos de aguas residuales. Las posibilidades recreativas y de uso de las riberas quedan drásticamente reducidas.

5.- Una **zona de reserva** de agua, constituida por la cuenca del Alberche, que puede ser utilizada por el Área Metropolitana mediante un costoso bombeo entre cuencas, cuando los embalses de la franja productora bajan de nivel.

Quedan, pues, modificados los caudales naturales de todos los ríos de la Comunidad. El río Manzanares, como caso más significativo de esta distorsión, tiene un caudal aguas abajo del Embalse del Pardo de 0,5 m<sup>3</sup>/seg., pero nada más atravesar la capital recibe 16 m<sup>3</sup>/seg del caudal casi constante procedente de los vertidos de más de 3 millones de habitantes. Esto puede considerarse como un verdadero trasvase de las cuencas altas de los ríos Lozoya, Jarama, Guadalix y Guadarrama al cauce bajo del Manzanares.

## 2.- LA EXPERIENCIA DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Al crearse la Comunidad Autónoma de Madrid en 1983, solamente uno de sus 179 municipios había abordado seriamente la depuración de sus aguas residuales. En efecto, el Ayuntamiento de la villa de Madrid había puesto en marcha a finales de la década de los 70 su "Plan de Saneamiento Integral de Madrid" (PSIM), conformando un sistema de siete grandes Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) que en 1984 conseguían tratar la práctica totalidad de los vertidos generados por sus tres millones de habitantes.

El resto de las instalaciones de depuración construidas hasta esas fechas, eran pequeñas depuradoras correspondientes a urbanizaciones, pequeños municipios y algunas industrias. Pero la escasa adecuación

de los diseños a las necesidades y, sobre todo, la mínima atención a la explotación y mantenimiento de las plantas, dio como resultado la obsolescencia, el abandono o el mal funcionamiento de la mayoría de dichas depuradoras.

En 1984 la calidad de las aguas de los ríos y embalses de la Comunidad de Madrid no alcanzaba, así, los niveles mínimos aceptables: los embalses de la zona productora se caracterizaban por su eutrofia (Pedrezuela, Valmayor y Las Nieves), o su mesotrofia creciente (Pinilla, Puentes Viejas, Santillana...); en la zona de cursos medios los escasos caudales de estiaje no permitían la autodepuración de los vertidos; finalmente los cursos de las zonas consumidora y receptora presentaban unas pésimas condiciones, en especial los ríos Guadarrama, Jarama y Henares.

Con este panorama, la Comunidad de Madrid se planteó la necesidad de una gestión integral del agua en su ámbito territorial, que uniera los conceptos de cantidad y calidad, con el fin de conseguir no sólo un abastecimiento eficaz a todos los madrileños sino también un saneamiento que minimizase el impacto medioambiental sobre los ríos y embalses. Así, en diciembre de 1984 fue aprobada la Ley 17/1984 reguladora del abastecimiento y saneamiento de agua en la Comunidad de Madrid, que establece los tres pilares básicos para la gestión del agua.

- 1º) Declara de "*interés de la Comunidad*" los servicios de aducción (abastecimiento en alta) y de depuración, mientras potencia el interés municipal de los servicios de distribución y alcantarillado.
- 2º) Encarga la explotación de todas las infraestructuras hidráulicas de la Comunidad, existentes y futuras, a la empresa pública Canal de Isabel II, que contaba ya con más de un siglo de experiencia en abastecimiento de agua a los madrileños.
- 3º) Regula la tarifa del agua, que debe ser única, incluyendo todos los servicios; igual, de forma que el mismo servicio debe costar igual a todos los usuarios; progresiva, penalizando el despilfarro, y suficiente, con el fin de garantizar un buen servicio.

Con esta cobertura legal, la Comunidad elaboró el Plan Integral del Agua en Madrid (PIAM), aprobado en 1985, con el fin de ordenar y jerarquizar las medidas legislativas, reglamentarias y de gestión, así como las inversiones necesarias en el medio hidráulico en base a los siguientes principios:

- La unidad del ciclo hidrológico
- La interdependencia de los conceptos de cantidad y calidad del agua
- La consideración del agua como bien de dominio público.
- La solidaridad entre los pueblos y regiones para la administración del agua, dada su desigual distribución en el espacio y en el tiempo.
- La necesidad de considerar el proceso de Ordenación Territorial en la definición de planes y programas.

El PIAM se fijó como objetivos la mejora del bienestar colectivo, la contribución al desarrollo regional y la mejora de la calidad ambiental. Para ello estructuró sus previsiones en cinco programas de actuación:

- Coordinación, legislación y gestión.
- Mejora de abastecimientos
- Infraestructura hidráulica municipal
- Depuración de aguas residuales y
- Recuperación de márgenes.

La mayor dotación de recursos económicos (12.200 millones de pesetas) correspondió al Programa de Depuración, acelerando las inversiones en los primeros años del Plan.

La elección del tipo de tecnología de las EDARs se acomodó a la diversa problemática existente:

- En la zona productora del Norte y Noroeste, donde las aguas residuales alcanzan los embalses de abastecimiento y donde se ubica una parte significativa de la población estacional, el diseño de las plantas constaba de un tratamiento físico-químico previo a tratamientos biológicos capaces de reducir nitrógeno. Con ello se eliminan los nutrientes causantes de la eutrofización de los embalses, y se pueden tratar correctamente las fuertes fluctuaciones estacionales de carga orgánica.
- En la zona consumidora, con vertidos de fuerte componente industrial, se diseñaron también procesos físico-químicos previos al tratamiento biológico, para poder actuar sobre los metales pesados y otros componentes tóxi-

cos inhibidores de los procesos de síntesis y descomposición biológica.

- En el resto de las zonas, con municipios pequeños o medianos, se eligieron tratamientos blandos o tratamientos de bajo consumo energético como filtros verdes, lechos de turba, lechos bacterianos y biodiscos.
- Se contempló en todos los casos la posibilidad de unir mediante emisarios e interceptores los vertidos de varios núcleos en una solo EDAR con el fin de aprovechar la economía de escala y garantizar una gestión técnica y económicamente eficaz.
- Finalmente, los emisarios se dimensionaron para una dilución 5:1 (cinco veces el caudal medio de aguas negras), con el fin de limitar la contaminación producida por el desbordamiento de las aguas de tormenta.

Con estos criterios se construyeron en los primeros diez años el sistema integral de saneamiento de la Comunidad de Madrid, que, a diciembre de 1994, se componía de más de 500 km de emisarios y 59 nuevas EDARs, a las que hay que sumar las 7 EDARs del sistema PSIM del Ayuntamiento de Madrid (Gráfico 2) dando servicio a un total de 86 municipios, y una capacidad de 7.459.000 habitantes equivalentes.

La inversión realizada figura desglosada por años en el Gráfico 3, ascendiendo en el período 1985-1994, a 28.760 millones de pesetas financiados con cargo a los presupuestos anuales de la Comunidad de Madrid.

Este conjunto de infraestructuras de saneamiento y depuración permitió reducir drásticamente la contaminación vertida a los ríos y embalses madrileños, tratando en 1994 alrededor de 700 Hm<sup>3</sup> de aguas residuales con una reducción media ponderada del 90% de la DBO<sub>5</sub> (demanda bioquímica de oxígeno), del 91% de los sólidos en suspensión (SS) y del 86% de la DQO (demanda química de oxígeno).

### 3.- EL PLAN DE SANEAMIENTO Y DEPURACIÓN DE LA COMUNIDAD DE MADRID (1995-2005)

A pesar del gran esfuerzo inversor realizado y el alto grado de cobertura del servicio de depuración alcanzado, con más de un 95% de la población censada conectada a los sistemas de saneamiento y depuración, acontecimientos como los periodos de sequía que periódicamente sufrimos, la aparición de normativa europea (Directiva 91/271), el proceso de elaboración del Plan Hidrológico Nacional y del Plan Hidrológico del Tajo, así como la necesidad cada vez más acuciante de reutilizar tanto las aguas depuradas como los fangos generados, aconsejaron la elaboración de un nuevo Plan para ordenar y definir las actuaciones a llevar a cabo en el periodo 1995-2005, manteniendo los principios inspiradores del PIAM e incrementando el enfoque medioambiental y de reutilización de recursos.

La promulgación en 1991 de la Directiva de la Unión Europea sobre tratamiento de aguas residuales urbanas exige la implantación de nuevos sistemas de saneamiento y depuración y la adaptación de los existentes en los 15 Estados miembros, con unas disposiciones muy estrictas en cuanto a los plazos y límites de emisión. Y aunque la responsabilidad formal del cumplimiento de los requisitos de esta Directiva es de los Gobiernos centrales, en España, el diseño, construcción y explotación de las infraestructuras sanitarias es abordado por los municipios y las Comunidades Autónomas en uso de sus respectivas competencias.

Para atender las obligaciones que se derivan de la Directiva sobre tratamiento de aguas residuales urbanas y del Plan Hidrológico del Tajo, la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional está desarrollando el Plan de Saneamiento y Depuración, que tiene un periodo de vigencia de 11 años, desde 1995 al año 2005.

Este Plan, el PSD, dentro de una política general de protección de las aguas, tiene dos objetivos fundamentales:

- El Primero de ellos garantiza la adecuada depuración de todas las aguas residuales generadas en la Comunidad de Madrid, de acuerdo con los criterios de la Directiva, que lo expresa mediante el concepto de HABITANTES EQUIVALENTE (1h.e. = 60 g DBO<sub>5</sub>/día). Así, aunque el porcentaje de población censada co-

nectada a sistemas de saneamiento y depuración es, como ya se ha comentado, superior al 95%, al hablar de cargas contaminantes, frente a un total de 12.250.684 habitantes equivalentes son debidamente tratados 10.225.814 h.e., lo que supone aproximadamente el 85% del total.

- El otro gran objetivo es asegurar que en las zonas sensibles de la Comunidad de Madrid, declaradas a los efectos de la Directiva de aguas residuales, y que abarcan las zonas de captación de agua en el Norte y Oeste de nuestra región, se alcanzan objetivos de protección ambiental más estrictos, limitando los aportes de nutrientes a las aguas.

Para conseguir estos objetivos ambientales, el PSD se estructura en cuatro programas:

- Programa 1: EMISARIOS Y DEPURADORAS
- Programa 2: SANEAMIENTO MUNICIPAL
- Programa 3: REUTILIZACIÓN DE AGUAS DEPURADAS
- Programa 4: DISPOSICIÓN Y REUTILIZACIÓN DE FANGOS DE DEPURACIÓN

El primer programa EMISARIOS Y DEPURADORAS incluye el grueso de las actuaciones del Plan, tanto en número como en inversión necesaria, ordenadas en los siguientes subprogramas:

- **Nuevas estaciones depuradoras** para la totalidad de los núcleos urbanos que carezcan de ellas. Dentro del segmento de aglomeraciones urbanas de más de 15.000 habitantes equivalentes pueden destacarse por su importancia las de Boadilla II, Villaviciosa de Odón, Majadahonda, Torrejón, San Sebastián de los Reyes (arroyo Quiñónez), Torrelodones-Galapagar y EDAR conjunta del arroyo Guatén. Las actuaciones ya en realización superan los 3.000 millones de pesetas, coste que ha sido financiado en un 80% por los Fondos de Cohesión.

Una actuación destacable por su importancia es el Saneamiento del Arroyo Culebro, que discurre por los municipios del Sur del Área Metropolitana. Esta actuación supone la construcción de 2 depuradoras, Cuenca Media y

Cuenta Baja, y un amplio sistema de colectores y emisarios que presta servicio a las urbanizaciones de la zona, con una capacidad de tratamiento de dos millones de habitantes equivalentes.

Las obras se están ejecutando en dos fases. La primera de ellas, ya en ejecución, tiene un coste de 7.000 millones de pesetas.. La segunda fase, que se iniciará este año 1999, tendrá un coste aproximado de 12.000 millones de pesetas.

El coste de esta actuación es financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y la Comunidad de Madrid.

- **Ampliaciones de estaciones depuradoras.** En función del grado de saturación actual de las depuradoras existentes y de las previsiones de desarrollo urbanístico de los núcleos urbanos se han acometido las obras de ampliación y/o mejora de las depuradoras ya existentes. Como actuaciones más destacadas podemos citar la ampliación de la EDAR de Arroyo del Soto en Móstoles, que ha supuesto una inversión de más de 1.100 millones de pesetas y las de los Escoriales, el Plantío, Navalcarnero, Algete, Casaque-mada, Alcalá Industrial, Aranjuez y La Poveda.

El importe de las actuaciones ya realizadas o en marcha desde 1996 hasta hoy es de unos 4.000 millones de pesetas.

- Otra línea de actuación es la **dotación de tratamientos de eliminación de nutrientes**, complementando y mejorando los existentes en 14 depuradoras ubicadas en “zonas sensibles”, que se ha iniciado en la depuradora de Bustraviejo para continuar a lo largo de 1999 con actuaciones en otras cinco depuradoras de la zona.
- **Emisarios.** En concordancia con las actuaciones en depuradoras, se han programado todos los nuevos emisarios y colectores interceptores de las aguas residuales a tratar hasta las instalaciones correspondientes. Las actuaciones ejecutadas o en marcha han supuesto una inversión de más

de 3.500 millones de pesetas, habiéndose ya redactado desde 1995 hasta hoy 41 proyectos de emisarios.

- Otro aspecto al que la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional presta gran atención es a la **garantía de la calidad del servicios de depuración**, para lo que están dotando a las depuradoras de dobles líneas de alimentación eléctrica, interconexión hidráulica de plantas, dotación de capacidad de reserva de tratamientos por sistemas, balsas de tormenta, etc. Todo ello con el fin de reducir el número de fallos en la explotación de las depuradoras por debajo de los límites admitidos por la Directiva Europea.

El Gráfico 4 recoge la situación actual de las EDAR en la Comunidad de Madrid.

El segundo programa del PSD es el programa de **Saneamiento Municipal** que tiene como objeto la renovación, mejora y ampliación de los alcantarillados urbanos. Sin embargo, dado que la competencia en materia de saneamiento es municipal, la programación y construcción de estas infraestructuras es abordada por los respectivos Ayuntamientos, con la ayuda técnica y financiera de la Comunidad de Madrid, a través del Patronato Madrileño de Áreas de Montaña (PAMAM) en los municipios de la Sierra Norte y de la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional en el resto de municipios.

Con este fin, la Consejería y los distintos Ayuntamientos están acometiendo inversiones en Redes Urbanas de abastecimiento y saneamiento de aguas” dentro del plan PRISMA, incorporando así los objetivos del Plan de Saneamiento y Depuración y en particular el cumplimiento de los requisitos exigidos para los sistemas colectores por la Directiva 91/271/CEE.

Asimismo la Comunidad de Madrid ha extendido, a todos los municipios la regulación de los vertidos líquidos industriales a los alcantarillados municipales, mediante la aprobación de la **Ley 10/1993 sobre vertidos líquidos industriales al Sistema Integral de Saneamiento** y sus Decretos de desarrollo. Con esta legislación se completa el proceso de ordenación y control de los vertidos líquidos industriales, estableciendo la prohibición de vertido de determinados productos y compuestos (mezclas

explosivas, colotantes, sustancias corrosivas, residuos peligrosos, etc.) y limitando el vertido de otras sustancias contaminantes. Con estas medidas se protegen las instalaciones de saneamiento, mejorando la explotación y conservación de las depuradoras existentes y, con ello, los recursos hidráulicos y el medio ambiente.

El programa de **reutilización de aguas depuradas** prevé una serie de actuaciones, algunas de ellas a corto plazo, con el fin de hacer realidad la reutilización de aguas tratadas en las EDARs para usos compatibles con la salubridad pública como el riesgo agrícola, de zonas verdes y campos de golf, la refrigeración y otros usos industriales, el mantenimiento de caudales ecológicos, etc. En el PSD están previstas instalaciones para la reutilización de las aguas depuradas en las EDAR de Fuenlabrada-Culebro, El Plantío, Arroyo de la Vega (Alcobendas), Casaquemada, Cuenca media del Guadarrama, Boadilla del Monte, Pozuelo-Húmera, etc. El Plan de Saneamiento Integral de Madrid establece una inversión de tres mil millones de pesetas para regar 21 parques con aguas procedentes de la EDAR de la China.

Finalmente, el PSD incluye un programa de **disposición y reutilización de fangos de depuración** para dar solución a los lodos que resultan del proceso de depuración de las aguas. En estos momentos se prevé la construcción de 2 plantas de secado térmico de fangos, para la obtención de fertilizantes agrícolas, y una planta de compostaje. Con estas actuaciones se da a los fangos el destino más apropiado para este tipo de residuos cuya utilización en la agricultura en nuestra región se regula por un Decreto del año 1998. Un aspecto importante a destacar es que en ningún caso se van a construir vertederos para los fangos de depuración. También es importante destacar que parte de los fangos generados se van a tratar conjuntamente con la materia orgánica de la basura en las plantas de biometanización de residuos urbanos, ya que esta mezcla favorece los procesos de metanización de la materia orgánica y la producción de biogás para su aprovechamiento energético.

Las inversiones necesarias para el conjunto de todas estas actuaciones definidas en el Plan de Saneamiento y Depuración ascienden a 132.970 millones de pesetas desglosados por años y programas en la Tabla 1.

El programa que precisa una mayor inversión es, como ya se ha comentado, el de **Emisarios y depuradoras**, con una inversión de 100.010 millones, lo que supone un 75% del total, la inversión en **Saneamiento municipal** es de 25.551 millones (19%) y para reutilización de recursos, agua depurada y fangos, se destinan 6.609 millones (6%).

Estas inversiones permitirán alcanzar en el año 2005 los requerimientos establecidos en la Directiva de aguas residuales urbanas.

#### 4.- FINANCIACIÓN DEL PLAN

Los elevados costes de inversión que implica la puesta en marcha de las actuaciones propuestas en el Plan de Saneamiento y Depuración, hace necesaria la participación financiera de la **Administración Central**. Así, en el Plan Nacional de Depuración, aprobado en 1995, se establece la ayuda estatal en un 25% de las necesidades de inversión de cada autonomía. En el caso de la Comunidad de Madrid, esta aportación se concreta en 27.003 millones, procedentes de los fondos de Cohesión europeos y de los Presupuestos Generales del Estado. Dicha aportación se regula mediante la firma de un Convenio de Cooperación entre ambas administraciones, habiéndose desarrollado en un 80%, quedando pendiente de concretar la cifra de 4.000 millones de pesetas.

Las actuaciones más relevantes que se han realizado en el marco de este convenio ha sido el Saneamiento y Depuración del Arroyo Culebro, con un coste total de unos 19.000 millones de pesetas. En otras actuaciones se han invertido otros 4.500 millones de pesetas, financiados en el 80% por fondos de cohesión.

El grueso de los recursos necesarios (gráfico 5) serán, sin embargo, aportados por la **Comunidad de Madrid** (Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional y Canal de Isabel II), para el programa de emisarios y depuradoras, y por los **Ayuntamientos** para los colectores municipales, con el auxilio también de la Comunidad a través del Programa PRISMA y el Patronato de Áreas de Montaña.

Finalmente, la reutilización de recursos y las ampliaciones de EDARs para los nuevos desarrollos urbanísticos, serán financiados en parte por vías extrapresupuestarias a través de acuerdos en la Comunidad

de Madrid con **otros agentes inversores públicos y privados** (Los Ayuntamientos y los promotores de los nuevos desarrollos urbanísticos).

## 5.- SITUACIÓN ACTUAL

Después de 3 años de aplicación de Plan de Saneamiento y Depuración de la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional ha iniciado los trabajos para su revisión.

Esta revisión es necesaria a la luz de tres factores fundamentales.

- La aprobación del Plan Hidrológico del Tajo, que establece los objetivos de calidad de las aguas y obliga a modificar algunas actuaciones del PSD para lograr esos objetivos.
- La aparición de nuevas necesidades en materia de saneamiento y depuración, consecuencia de los fuertes desarrollos urbanísticos que se han producido en algunas zonas de nuestra región.
- La necesidad de acomodar el ritmo inversor previsto en el año 95, que ha sufrido un desfase que aconseja redefinir los horizontes inversores de los próximos años.

Los objetivos generales de la Actualización y Revisión del PSD son tres:

- El conocimiento del grado de ejecución, a la fecha, del PSD.
- El diagnóstico de la calidad de las aguas superficiales de la Comunidad de Madrid.
- Y la actualización del PSD

Para toda revisión, actualización o, incluso, modificación de una planificación, es obligado conocer en primer lugar lo que de ella ha pasado a realización. Será necesario saber a continuación el nivel de cumplimiento de lo realizado respecto a lo planificado y deducir si el objetivo que se pretendía ha sido satisfecho, técnica, social y económicamente.

El primer objetivo enunciado comprenderá necesariamente qué ha sido ejecutado, cómo ha dado solución, parcial o totalmente, al problema que lo motivaba y en último término qué inversión ha exigido, citando la financiación de la misma.

Conocido el grado de ejecución del PSD estrictamente y de forma simple, si no se tuvieran en cuenta otras circunstancias, se podría plantear

una revisión que recogiera sencillamente las actuaciones pendientes de llevar a la práctica.

Sin embargo, la revisión y actualización que ahora se pretende, seguirá una filosofía más amplia que, partiendo necesariamente del objetivo de grado de ejecución del PSD, contemplará el conocimiento de calidad de las aguas superficiales, que es precisamente el segundo objetivo a alcanzar.

Lograr este segundo objetivo permitirá conocer la calidad de las aguas en el momento presente y su evolución en el tiempo, pudiendo comprobar la respuesta habida de las actuaciones ya operativas. Este segundo objetivo deberá incluir un diagnóstico que será base para acometer la actualización final del PSD.

La herramienta para el cumplimiento del conocimiento de la calidad de las aguas, además de la información facilitada por los organismos relacionados con el agua y de los estudios realizados por la propia Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional, consistirá en una campaña de muestreo definida por una tipología específica, sobre una red de puntos representativa y la correspondiente analítica de diferentes parámetros que permitan evaluar la calidad del agua. Estas determinaciones se complementarán con el uso de modelos matemáticos que permitirán la determinación del estado del agua de la red fluvial de nuestra región.

El tercero, último y fundamental objetivo, se beneficiará del éxito de los dos anteriores y definirá la actualización propiamente dicha del PSD.

Además, de la selección, presupuesto y programa de actuaciones, comprenderá necesariamente un Programa de Seguimiento del PSD actualizado que incorporará, como elemento nuevo e indispensable, un modelo de simulación que facilite la respuesta y conocimiento de la calidad de las aguas circulantes frente a situaciones modificativas, modelo que se aplicará ya en la propia realización del Presente Estudio.

Se pretende en definitiva actualizar y revisar el Plan de Saneamiento y Depuración (1995-2005) manteniendo el mismo período de vigencia pero incorporando datos, conocimientos y normativa procedentes de distintas fuentes que permitirán fijar metas más adecuadas a la realidad presente y con criterios ajustados a las nuevas normativas.

Por tanto, no se pretende, ni ha de ser, un nuevo Plan de Saneamiento y Depuración; sino que dentro de su causalidad y fines, se revise el punto de partida y se redefine, es decir, se actualicen las actuaciones generadas, infraestructuras, estudios, seguimiento y normativa que ayude a su desarrollo. Todas estas actuaciones, ya en marcha, deberán completarse antes del final de este año.

Otra línea de actuación de la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Regional en materia de saneamiento y depuración es la aplicación en su integridad de la Ley 10/1993, de Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento. El cumplimiento estricto de esta Ley redundará:

En una mejora de los rendimientos de las depuradoras, al disminuir los aportes de elementos como los metales pesados y otros productos químicos que interfieren en los procesos de depuración.

- Una reducción de los metales pesados en los lodos de depuración, lo que reducirá el volumen de lodos que no pueden utilizarse en agricultura.
- Una mejora de la calidad del agua vertida desde las depuradoras a los cauces públicos, que se traducirá en una mejora del medio ambiente y de salud pública.

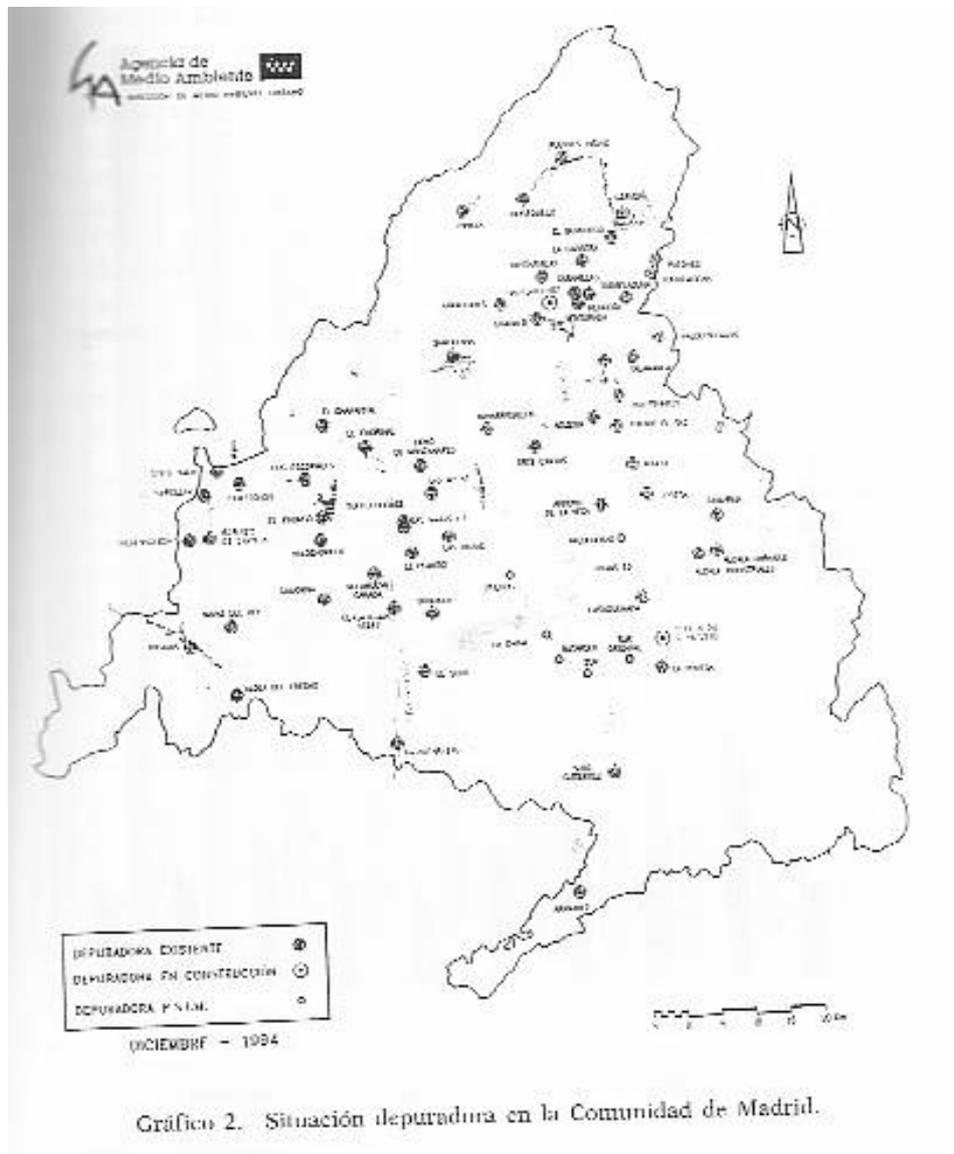
Para conseguir estos objetivos, la Dirección General de Calidad Ambiental va a reforzar de forma importante las unidades administrativas relacionadas con la gestión de las aguas.

## 6.- CONCLUSIÓN

El plan de Saneamiento y Depuración de la Comunidad de Madrid, es el instrumento fundamental de la política de calidad del agua, dando respuesta a la necesidad de compatibilizar el desarrollo económico con la calidad ambiental del medio urbano y con la preservación del medio natural (desarrollo sostenible) y su objetivo es el de evitar la contaminación del agua, garantizando una adecuada calidad de los ríos y embalses de la Comunidad de Madrid y facilitando la reutilización del agua depurada y el ahorro de este recurso natural, tan valioso como escaso.



Gráfico 1. Zonificación del sistema hidrico de la Comunidad de Madrid, según usos de agua.



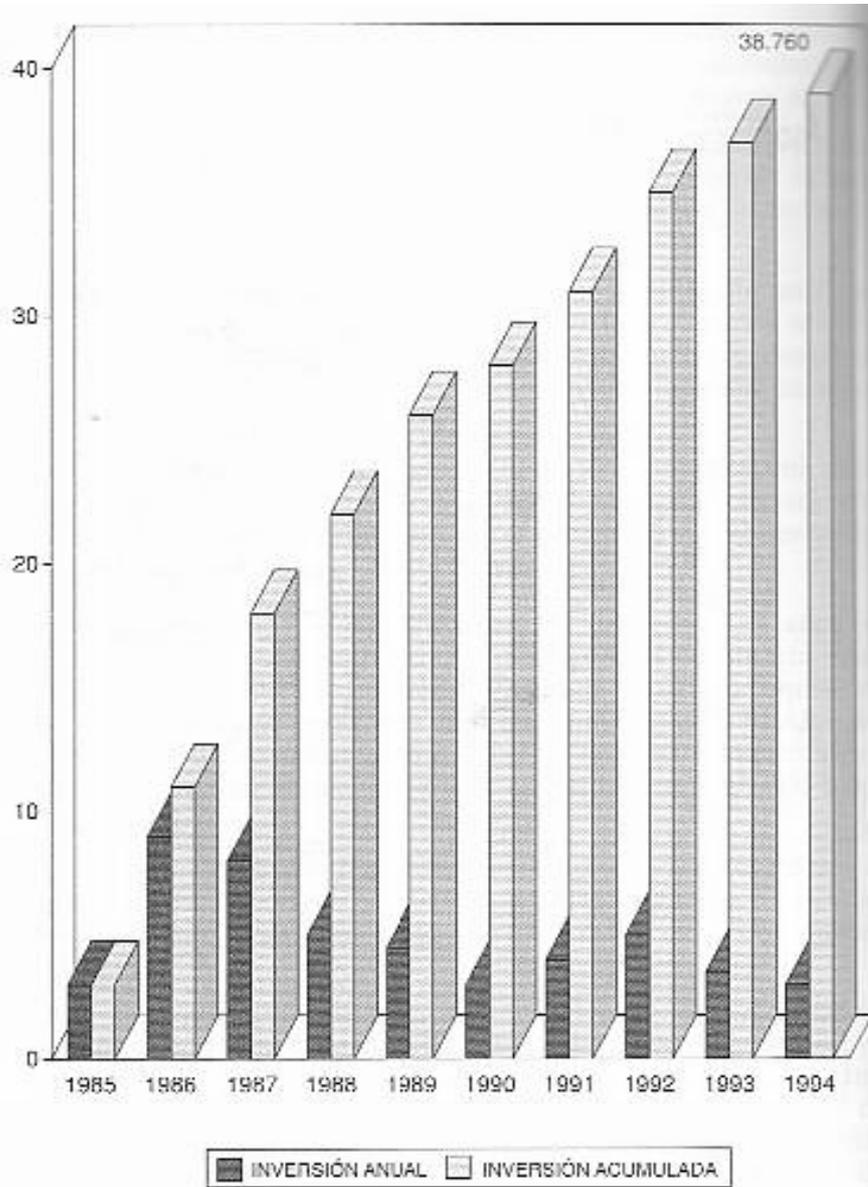
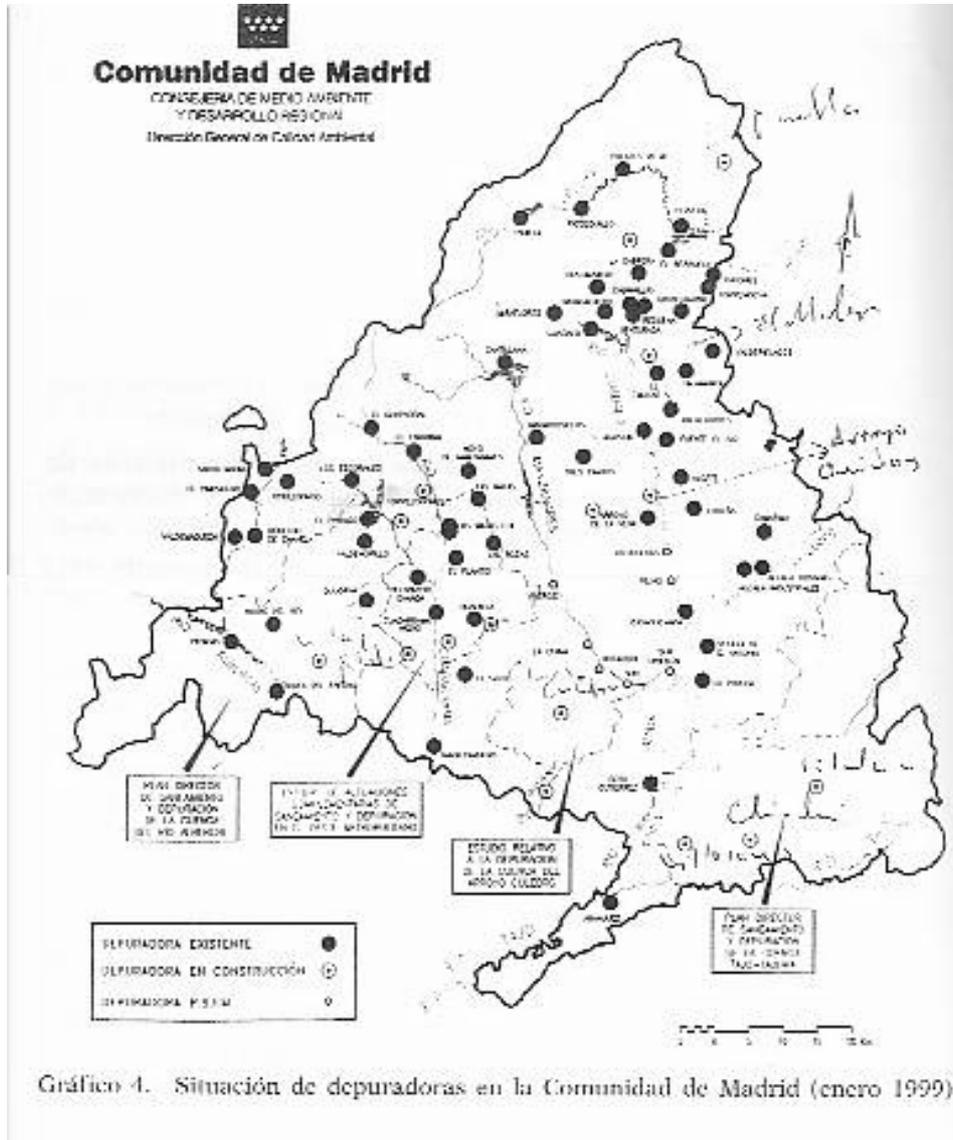


Gráfico 3. Inversiones realizadas por la Comunidad de Madrid en depuración (Umisarios y Filars)



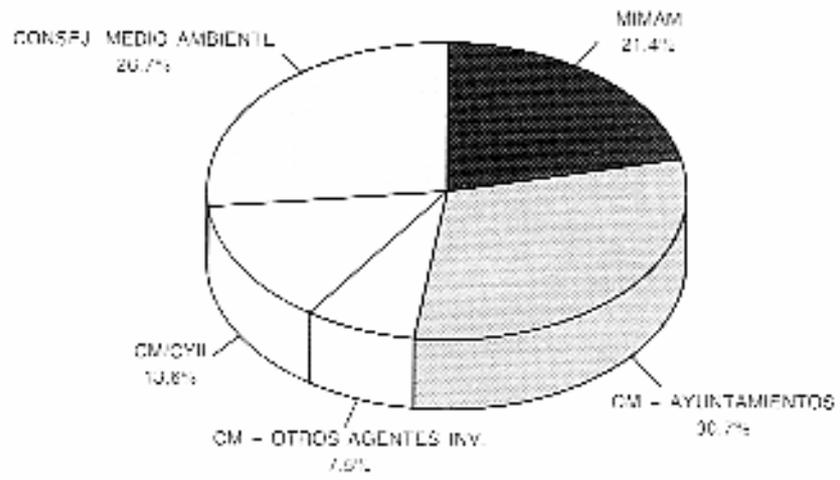


Gráfico 5. Distribución de financiación por organismos.

Tabla 1. PLAN DE SANEAMIENTO Y DEPURACIÓN DE LA COMUNIDAD DE MADRID (1995-2005)  
RESUMEN DE INVERSIONES

PROGRAMA	PROGRAMA	Inversiones (millones de pesetas de 1994)									
		Año 1995	Año 1996	Año 1997	Año 1998	Año 1999	Año 2000	Total 1995-2000	Prom. 2001-2005	Total	
1. Emisores y depuradoras	101. Nuevas estaciones depuradoras 102. Ampliación de estaciones depuradoras 103. Reducción de nutrientes en zonas sensibles 104. Emisores 105. Garantía de la calidad del Servicio de Depuración 106. Tratamiento de efluentes especiales  Total Programa 1	830	5.225	5.995	7.730	8.810	9.021	38.681	11.110	49.771	
		82	2.922	1.591	1.390	1.785	775	7.865	2.919	12.784	
		1.453	3.442	1.831	1.271	3.241	3.138	18.102	205	16.678	
			58	58	1.406	1.542	1.342	4.200	11.606	15.806	
			75	75	175	250		675	225	900	
2. Saneamiento Municipal	Total Programa 2	2.114	2.115	1.690	2.432	2.475	2.475	13.301	1.850	25.552	
3. Recaptación de aguas residuales	Total Programa 3	1.497		300	604	604	604	3.609	3.000	6.509	
4. Disposición y canalización de lodos de depuración	401. Disposición de lodos de depuración 402. Canalización de lodos de depuración  Total Programa 4			200				200	400	600	
				20	20	20	20	20	100	100	200
				20	20	20	20	20	300	500	800
	<b>Total</b>	<b>6.026</b>	<b>13.179</b>	<b>15.847</b>	<b>17.794</b>	<b>18.527</b>	<b>17.567</b>	<b>88.556</b>	<b>44.412</b>	<b>132.978</b>	

# **El Agua: Un Recurso Agotable**

SEGUNDO JIMÉNEZ GÓMEZ.  
*De la Real Academia de Farmacia.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Hace tiempo que diversos Organismos Internacionales, gravemente preocupados por los problemas del suministro y consumo de agua, tratan de difundir con variadas actividades, las cuestiones relacionadas con ellos. Entre sus acciones está la celebración anual del Día Mundial del Agua, a la que esta Real Academia de Farmacia quiere sumarse con este acto, no sólo por razones de solidaridad, sino porque al mismo tiempo sirve a los fines que le son propios.

Quizá habría que comenzar preguntándose si ¿son necesarias este tipo de actividades? La contestación afirmativa surge de inmediato con sólo saber que 1200 millones de la población mundial, en este momento, no puede beber agua sin riesgo de contraer enfermedades, e incluso morir; cifra nada despreciable que no deja de ser una grave deuda moral y una falta de compromiso político. Pero aún hay más; con las previsiones demográficas actuales, y a pesar de que ha disminuido un poco el crecimiento, para el año 2025 la población habrá aumentado en más de 3000 millones de personas, lo que, estadísticamente, lleva implícito que la cuota de agua “per capita” se habrá reducido al 66% de la actual.

Surge a continuación otra pregunta ¿Está todo dicho sobre el agua? Sinceramente, creo que no. Por lo pronto, se reclama a gritos que la cuestión sea objeto de un enfoque político y económico, con criterios holísticos, es decir con una visión a muy largo plazo y extendida a la totalidad del planeta. El correcto conocimiento del medio sólo puede lograrse si se concibe como un todo integrado, en el que cada una de sus partes se analice y valore en el seno de aquel, pues, como decía von Humboldt hace ya casi dos siglos, “en la gran cadena de causas-efectos ninguna cosa ni ninguna actividad deberá ser tomada aisladamente”.

Pero aún queda una tercera pregunta: ¿Está todo suficientemente difundido entre la población? Y aquí el no es todavía más rotundo. La vida del hombre está salpicada de paradojas, pero la del agua es, sin duda, la más incomprensible de todas. De una parte, y a lo largo de toda la Historia, el hombre lucha por el agua, se pelea con sangre y con saña; lo que yo llamaría las hidroguerras están a la orden del día; los ríos internacionales, o ríos compartidos, de los que sólo en los países en vías de desarrollo hay más de 200 cuencas, son un continuo semillero de problemas.

Limitándonos a cuestiones de hoy, basta mirar el Oriente Medio, donde el Nilo y el Jordán son causa de inestabilidad en sus respectivas zonas. La presencia israelí en los Altos del Golán, aunque quizá no se diga, puede encontrar también sus motivos en que es allí donde se encuentran buena parte de los cauces que alimentan el Jordán y el lago Tiberiades. Las aguas del Nilo, por su parte, proceden de territorios distintos a Egipto, y abastecen a nueve países de los cuales Egipto es el último en recibirlas. Incluso en la zona de los ríos Tigris y Eufrates, a pesar de su mayor abundancia, existen problemas y han fracasado los acuerdos entre Irak, Siria y Turquía para hacer un reparto equitativo de las disponibilidades. Las naciones, las familias y los individuos han competido siempre por el agua, que es sin duda condición necesaria para la paz, aunque no sea suficiente.

En contraposición, y ahí es donde está la paradoja, quienes disponen o disponemos de ella la derrochamos sin tino ni tasa, de la manera más inconsciente e incongruente. Se usa y abusa como si sobrara en todas partes, y el consumo es tanto mayor cuanto más cómodo sea el suministro. El Banco Mundial ha denunciado con insistencia que una buena parte de los habitantes de países africanos, asiáticos o suramericanos, tienen que desplazarse más de 500 o 1000 metros de su punto de residencia habitual para conseguir el agua que necesitan para beber, con lo que ello acarrea de incomodidad y pérdida de tiempo y de esfuerzos. Pues bien, no hace tantos años, menos de 50-55, que muchos moradores de pueblos españoles tenían que desplazarse esas distancias, e incluso más, para tener una mínima cantidad de agua con la que satisfacer sus necesidades básicas.

Bastarían estos hechos para justificar la Sesión de hoy.

## 2. DISPONIBILIDADES.

Las disponibilidades de agua, al menos estadísticamente son, prácticamente, fijas. Como es conocido, la sabiduría de la Naturaleza, determina que la cantidad de agua evaporada de los mares sea superior a la que la lluvia les devuelve, en tanto que ocurre al contrario en las áreas de tierra firme del planeta. Esta diferencia, a la que se da el nombre de ciclo hidrológico del planeta, es la que los seres vivos, no sólo el hombre, puede utilizar y si gasta más es a costa de consumir parte de lo que constituye el equilibrio de la Naturaleza y a la postre ha de ir en detrimento de ésta. Así es de sencillo.

A escala mundial el ciclo hidrológico medio suministra un caudal de 45.000 km<sup>3</sup> por año, y con ella hay que atender a:

- a) Mantenimiento de los ecosistemas: caudal ecológico.
- b) Consumo doméstico.
- c) Consumo agrícola.
- d) Consumo industrial y minero.
- e) Transferencias al mar, a otros territorios, o a acuíferos subterráneos.

Nuestro particular ciclo hidráulico presenta la siguiente estructura:

Precipitación.....	346 km <sup>3</sup> /año
Evaporación.....	235 “
Diferencia.....	111 “

Esta diferencia, se descompone de la siguiente forma:

Escorrentía superficial .....	182 km <sup>3</sup> /año
Recarga de acuíferos .....	29 “
Transferencias (al mar o a otros Territorios) .....	2 “

Suponiendo que lo que va a la recarga de acuíferos se recupera, quedan 109 km<sup>3</sup>/año que, sobre la base de 39 millones de habitantes, pro-

porciona una disponibilidad media de 2795 m<sup>3</sup>/persona y año; pero no se puede olvidar que lo disponible no es lo consumible, puesto que hay que atender al **caudal ecológico**, de cuya conservación depende la sostenibilidad del sistema global.

Merece la pena, antes de seguir adelante, comentar algo sobre el **caudal ecológico**. Como tal se entiende el caudal mínimo que es necesario mantener en los cauces para garantizar la biocenosis y la conservación del Medio Natural, o dicho de manera más breve: es el caudal necesario para mantener la vida, en su más amplia concepción. Tan importante es, que en España, algunas Confederaciones Hidrográficas lo consideran prioritario, después del abastecimiento de la población. Esta prioridad es comprensible desde la perspectiva de la opinión pública. Pero si el caudal ecológico tiene la suprema función de garantizar la conservación del Medio Natural, ni siquiera el abastecimiento de la población puede ser condicionante más allá de situaciones coyunturales, o meramente puntuales. Una situación continuada de esta naturaleza no sería aceptable, pues supone la incapacidad de los organismos responsables de garantizar el suministro.

El problema del caudal ecológico, está en la falta de claridad para definir el criterio que establezca su cuantía. Para los más exigentes, cual es el caso del World Resources Institute (“Toward Sustainable Development” Oxford U.P. 1992) el caudal ecológico debe de ser el 80% del flujo de agua puesto en juego en el ciclo hidrológico; en este supuesto a escala mundial sólo podrían utilizarse 9000 km<sup>3</sup>/año, y la disponibilidad media por persona para la población actual del Planeta sería de 1550 m<sup>3</sup>/año. Para los menos conservadores, el caudal ecológico, puede disminuirse hasta el 50%, quedando otro tanto para los restantes consumos. En todo caso, parece evidente, que el porcentaje ha de ser variable y el índice de referencia se ha de modificar en función del área geográfica que se considere, de forma que en las zonas secas ha de ser más inflexible que en las húmedas.

En toda la gestión del agua habría que partir de un axioma inviolable: El agua sólo será un recurso renovable si se protegen todos aquellos factores que contribuyen a mantener el ciclo hidrológico.

El consumo mundial de agua se ha triplicado desde 1950. En la actualidad se eleva a unos 4500 km<sup>3</sup>/año, y el consumo continúa aumentando, con todos los riesgos que ello implica. Por otra parte, el consumo “per cápita” sólo ha crecido un 50%, lo que no es una cifra positiva, sino que pone de manifiesto la influencia de la presión demográfica y que la población crece a mayor ritmo que los suministros. Esto, explica que las tensiones en torno al agua alcancen también a los países de recursos abundantes.

La desigual distribución geográfica de los recursos es, junto al crecimiento demográfico, otro factor no menos preocupante en cuanto al riesgo de agotabilidad. Citaré sólo el caso de China que con más del 22% de la población del planeta dispone sólo del 8% de los recursos mundiales de agua; y, también aquí, el consumo sigue creciendo.

En lo que a España se refiere nuestro consumo es de 1174 m<sup>3</sup>/ persona y año, equivalentes al 42% de la disponible. Nuestro caudal ecológico es, por tanto, el 58% del flujo hidrológico; es decir, próximo al límite inferior, lo cual es preocupante en un país como el nuestro, donde buena parte de la zona centro, centro-este y sur forman la España seca, en la que debiera mantenerse un caudal ecológico próximo al límite superior del 80% del flujo hidrológico.

### 3.- SÍNTOMAS ESCASEZ Y DE IRREVERSIBILIDAD.

El agotamiento de recursos está precedido por la irreversibilidad de recuperación, y se llega siempre que la demanda de los seres vivos, no sólo del hombre –naturalmente-, es superior a la oferta de la Naturaleza, que tiene su límite en el mantenimiento de la biocenosis.

Por otra parte, el mundo desarrollado tiene una deuda social, con los países en vías de desarrollo del que ha de derivarse un próximo crecimiento del consumo, pues está obligado a suministrar agua tanto a la población que hoy no la tiene, o no la tiene cerca, como al incremento de habitantes que se produzca en un futuro inmediato. También habrá de mejorar el consumo de los pueblos de menor nivel de vida, que hoy disponen de poco más, o de poco menos, que la cantidad justa para subsistir.

Y, además, deberá contar con los desequilibrios de recursos que se presentan a lo largo de la geografía mundial, cual es el caso de China, citado.

Hay una serie de países o áreas geográficas, en los que el problema será más acusado: En Oriente Medio la población va a pasar de 215 millones en 1995 a 443 millones en el 2030. Los países norteafricanos Marruecos, Argelia, Libia, Tunes y Egipto, pasaran en el mismo periodo (1995 a 2030) de 137 millones a 234 millones. El Africa subsahariana, en análogo periodo pasará de 600 millones a 1370. En Pakistan la población crecerá, también en el periodo citado de 126 millones a 224 millones. La India tiene en este momento (1999) 1000 millones y alcanzará los 1400 millones en el 2030. Se estima que en menos de cinco años todos estos países, y alguno más del África Oriental, tendrán renovaciones anuales de agua inferiores a la media de la demanda.

Ésta es, pues, la tónica. De aquí que en el Documento de las Naciones Unidas, de abril de 1997, titulado "Evaluación Completa del Agua Dulce", no se haya dudado en señalar que una tercera parte de la población mundial viven en países que tienen una escasez entre moderada y alta, pero que esa proporción podría alcanzar las dos terceras partes en el 2030.

El contraste está en los 1000 millones de personas que tenemos un consumo elevado, que está en clara relación con el grado de desarrollo de los países, como se puede observar en la Tabla I.

TABLA I

Grupo de Países	Consumo anual "Percápita" m <sup>3</sup>	Distribución sectorial del consumo		
		Agrícola	Industrial	Doméstica
España	1.174	80	7	13
Ingreso bajo	386	91	5	4
Ingreso medio	453	69	18	13
Ingreso alto	1.167	39	47	14

Fuente: Instituto Mundial sobre Recursos. 1.990

Como se puede apreciar, España, que aún siendo un país desarrollado no está entre los de cabeza, puesto que nuestra renta “per capita” es inferior al 90% de la media de los países de la U.E., tiene un consumo que está ligeramente por encima de la media de los países de ingreso alto. Esto indica claramente que nuestro consumo “per capita” no debiera crecer.

La renta “per capita”, además de ser un indicador de consumo, lo es también del porcentaje de población que dispone o no de agua potable. En la Fig-1- se puede observar que en aquellos países donde la renta es superior a los 10.000 \$, está servida la práctica totalidad de la población, pero por debajo de los 1000 \$ la población carencial es superior al 40%.

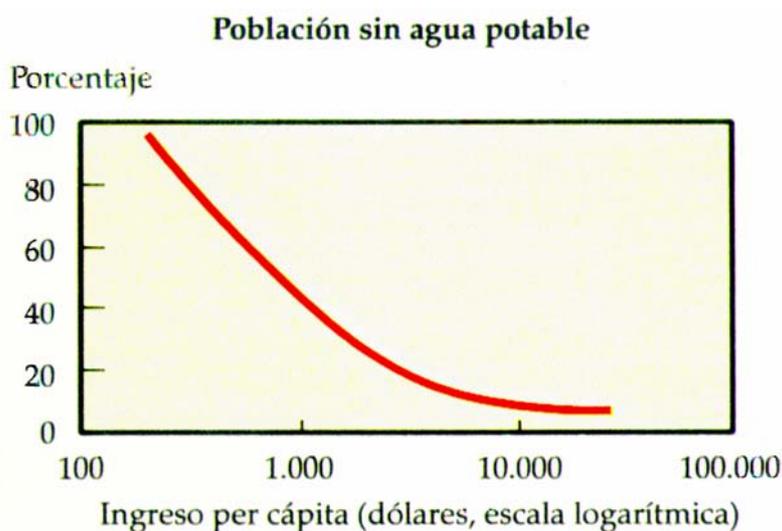


Fig -1-

#### 4.- CAUSAS DE LA ESCASEZ.

Los tres sectores de consumo están fuertemente afectados por la demografía, pero quizá los de mayor incidencia sean el doméstico y el

agrícola, sin que esto signifique descartar el industrial. En el doméstico por lo que obliga a aumentar las áreas urbanas y en el agrícola por la mayor demanda de alimentos, lo se traduce en el aumento de las tierras de cultivo o en el incremento de su productividad.

En uno y otro ámbito, la causa más inmediata son las pérdidas. Hay redes de suministro doméstico en las que se pierde más del 25%, y en las agrícolas se llega al 40%, lo que puede suponer no menos de 2.600 km<sup>3</sup>/año, cantidad suficiente, para aliviar las graves situaciones carenciales del momento, al menos en términos de valores medios.

Con independencia de las pérdidas, el consumo agrícola es siempre elevado. La propia reacción de fijación fotosintética implica un consumo real de agua, pero además la evaporación y transpiración ejercen un papel decisivo. Por ejemplo, el cultivo de 1 kg de trigo, en una región española de máxima radiación, sólo por evaporación, origina unas pérdidas 500 litros de agua. Y ahí están los cultivos de algodón, con necesidad de 10 m<sup>3</sup>/kg, el de arroz con 4 m<sup>3</sup>/kg, o el de caña de azúcar con 1 m<sup>3</sup>/kg.

Los cultivos de regadío son especialmente consumidores. Su mayor productividad, e incluso los hábitos alimentarios, han sido determinantes para que, a lo largo del siglo que termina, las superficies de regadío se hayan incrementado en un 500%. No obstante, el ritmo de crecimiento ha disminuido en los últimos años a causa de que las prácticas de riego incorrectas, la pérdida de suelos adecuados o su progresiva salinización y la carestía y competencia en la compra del agua, han hecho temer por sus rendimientos futuros. Las áreas de regadíos están creciendo sólo a un ritmo del 1%, lo cual, contribuirá a no aumentar el consumo de agua. Pero esto tampoco es bueno, porque como la población mundial crece al ritmo del 1,7%, es decir, superior al de los regadíos, se compromete la producción y suministro de alimentos. En todo caso, hacia el futuro, la condición básica para implantar regadíos ha de ser la sostenibilidad de los acuíferos que les sirvan.

Sin embargo, sí parece conveniente cambiar los hábitos alimentarios en el sentido de acortar la cadena trófica. El 38% de los cereales producidos en el planeta se usa para la alimentación y cebo del ganado de consumo, que además consume forraje, que es de regadío; de esta manera,

¡producir un kg de carne de consumo puede haber necesitado más de 20 m<sup>3</sup> de agua!

A la industria se le suele acusar de ser gran consumidora de agua; pero esto no es demasiado exacto, al menos en la actualidad, pues el sector mantiene una viva preocupación por disminuir su consumo. La industria papelera ha sido una de las más destacadas. A principios de siglo se precisaba un m<sup>3</sup> de agua por cada kilogramo de papel, hacia 1990 se habían reducido a 64 litros/kg de papel, y en lo que va de década, en Alemania, todavía se ha disminuido hasta 20-30 litros/tonelada de papel. Tan espectacular reducción se debe, por supuesto, a mejoras técnicas, pero también a la modificación de tarifas de vertido de las aguas residuales. La fig-2- es suficientemente expresiva:

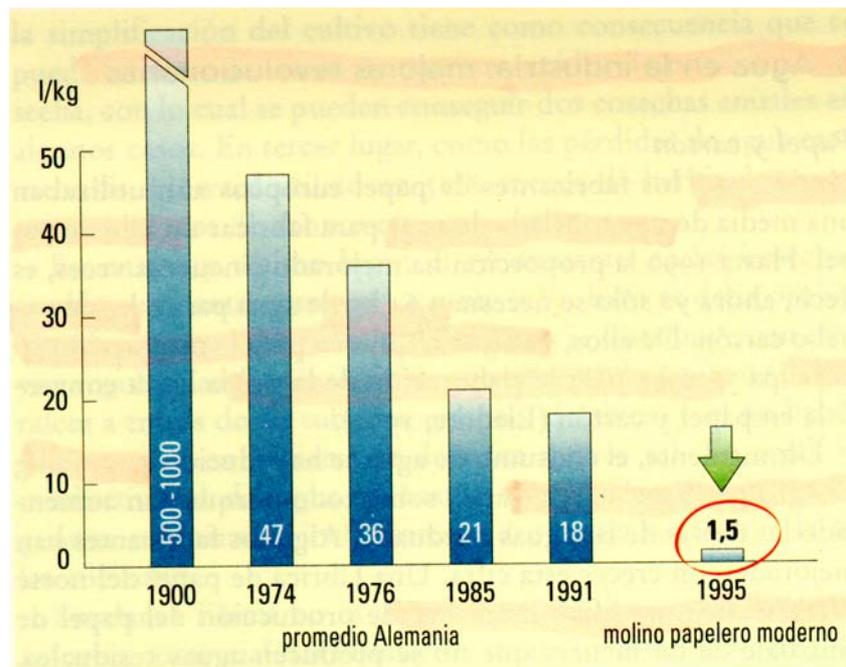


Figura 2-

Junto con la industria papelera, la química, el petróleo, la siderúrgica y las de obtención de metales, son de las más consumidoras. La siderúrgica, pese a haber disminuido mucho el consumo, aún emplea  $14 \text{ m}^3$  por tonelada de acero. También son buenas consumidoras las hilaturas de algodón, que hasta hace poco necesitaba 5000 litros de por cada kg de fibra y, después, su transformación en ropa, requería otros 165 litros más; sin embargo, a lo largo de esta década se han disminuido los consumos en un 80% y los vertidos de aguas residuales en un 92%.

El consumo doméstico no tiene por qué ser demasiado elevado. Aún siendo el agua imprescindible para la vida, lo que intrínsecamente necesita el hombre es **un litro diario por cada 30 kg de peso**, es decir, por término medio le bastan 2,5 litros/persona y día. La realidad es otra pues hay otros motivos de consumo –higiene, limpieza, manipulación doméstica de alimentos, etc- que le elevan a más de 90 l/día, equivalentes a unos  $30 \text{ m}^3$ / persona y año; pero tampoco esto es válido, pues en los países con alto nivel renta, como USA, se llega hasta los 300 l/día, equivalentes a casi  $110 \text{ m}^3$ /año. Y la cifra que normalmente se maneja para tener en cuenta las necesidades urbanas, derivadas de la vida en sociedad, incluidas las pérdidas en los suministros, es la de  $300 \text{ m}^3$ /persona y año. La realidad es que de lo que una persona necesita a lo que por término medio consume hay una gran diferencia, sobre la que será necesario economizar.

## 5. BÚSQUEDA DE SOLUCIONES.

Durante mucho tiempo la política seguida para satisfacer una demanda creciente ha sido incrementar las captaciones, recurriendo a puntos aguas arriba de los cauces; con el correspondiente coste económico y en sostenibilidad del recurso.

La solución más inmediata fue recurrir a las aguas subterráneas. Todo hace suponer que, en la mayoría de los casos, esto se hizo sin valorar los índices de reposición, lo que constituía el mejor camino para agotarlas. Arabia Saudí, China, India, México, y otros países, incluidos USA y nuestra propia nación, se lanzaron a la extracción y consumo de agua de forma, al menos, dudosamente correcta.

Arabia Saudí, está metida en la aventura de producir trigo, en cantidad suficiente para autoabastecerse y para exportar. Emplea para ello aguas subterráneas fósiles, con miles de años de antigüedad. Mediante una extracción de 5.200 millones de m<sup>3</sup>/año cubre el 75% de sus necesidades, lo que hace prever su agotamiento en 50 años.

En China hay más de diez ciudades cuyos niveles de aguas freáticas bajan de uno a dos metros por año.

En el sur de la India (Estado de Tamil Nadu) tras de 10 años de extracción de agua se han producido descensos de niveles freáticos de 25 metros, circunstancia que se añade al hecho de tener ocho o nueve meses de sequía y tres o cuatro de inundaciones.

El abastecimiento de Mexico DF se hace en buena parte con aguas subterráneas, pero el ritmo de extracción es un 40% superior al de reposición.

En la zona Noroeste de Texas más de la cuarta parte de las reservas están ya agotadas.

Y es bien conocido el caso español del acuífero de La Mancha, donde se han llegado a incendiar las turberas de Daimiel al desecarse por la bajada de niveles freáticos.

Se está recurriendo, también, a trasvases en gran escala -como el del río Yangtse al Amarillo-, a obras de ingeniería enormes, y de tal alto coste, que muchas de ellas se queden en la fase de proyecto, como parece ha sucedido con el fantástico acueducto submarino de Alaska a California.

La desalinización de aguas marinas es una moderada realidad. Y digo moderada porque en el mundo hay unas 8.000 plantas desalinizadoras, con una producción global de agua dulce de poco más de 5 km<sup>3</sup>, es decir el 5% del ciclo hidrológico español. El proceso no tiene problemas técnicos, pero sí económicos, por lo que, de momento, no es una solución generalizada, aunque sea válida para zonas turísticas secas y áreas insulares.

Hay soluciones más modestas, de alcance local y bajo coste, como es mantener la capacidad de retención de agua del suelo, hacer pequeñas presas para recoger aguas de superficie, frenar la erosión con bancales,

explanaciones y pequeños muros de piedra, según curvas de nivel, etc., todo lo cual contribuye a allegar algún recurso y evitar pérdidas.

De todas maneras, las crisis del petróleo de los años 73 y 78, tuvieron la virtud de hacer ver a la humanidad algo tan elemental como es el que la mejor manera de mejorar la demanda es el ahorro. Los programas de ahorro energético de aquellos años proporcionaron unos resultados espectaculares, por lo que el sector industrial los trasladó al agua en muy poco tiempo. Está muy claro que es más barato ahorrar agua que buscar nuevas fuentes de suministro.

Para ahorrar agua hay que comenzar por evitar las cuantiosas pérdidas; pero no es sólo esto, sino que, además, hay que depurar, reciclar y reutilizar. Estas son las únicas directrices que pueden racionalizar el uso del agua y convertirla en un producto sostenible.

Incluso sin necesidad de penalizaciones, ni de grandes incentivos económicos, la industria ha optado con decisión por el reciclado. Buena parte del agua industrial se usa para refrigeración, por lo que para su reciclado sólo precisa ser enfriada. En otros casos, y dadas las exigencias que hoy se imponen a los vertidos, los costes de tratamiento para su reciclado son inferiores a los de suministro y depuración previa a su vertido.

El sector industrial es donde más claro y arraigado está el concepto de productividad del agua, y hay subsectores, como los de Informática, Electrónica, Aeronáutica, Automoción, Pintura y Alimentación, y en ocasiones, también, la Industria Farmacéutica, que en los últimos años han logrado excelentes resultados. Hoy, en toda industria actualizada y al día, se deben depurar y reciclar, prácticamente, todas las aguas residuales, de manera que sólo sea necesario reponer la evaporación.

En el sector agrícola las cosas no están claras. Está superado el riego a manta, aunque no del todo abandonado, e incluso el de aspersión. Este tiene de común con aquel que se empape gran parte del suelo no sembrado, con el inconveniente añadido de las elevadas pérdidas por evaporación.

En el riego a manta hay una variante conocida como “riego por impulsos”, que consiste en hacer primero un empape breve que satura los poros, y poco después el riego real, que ahorra agua al evitarse una prolongada infiltración, aunque tampoco tiene una gran aceptación.

La gran novedad en los sistemas de riego ha sido el riego por goteo; técnica desarrollada por Israel en los años 60-70, que consiste en distribuir el agua en los campos de cultivo a través de tuberías terminadas por un gotero que se coloca muy próximo a la raíz de la planta, lo que permite aprovechar no menos del 90% del agua aportada, puesto que se evitan las pérdidas por filtración y por evaporación. El diseño de los goteros permite regular y homogeneizar el caudal en todos los puntos de aporte, modificando las pérdidas de carga según la distancia a que estén situados del punto de alimentación. Por otra parte, gracias al uso de sistemas automatizados mediante ordenadores, el suministro de agua se hace en el momento y en la cantidad adecuada. Incluso es un buen sistema para fertilizar por fertirrigación.

Hay una alternativa más económica basada en canalizar el agua a través del cultivo mediante tubos porosos que riegan por exudación, o bien se practican orificios puntuales en los tubos, a intervalos coincidentes con los lugares donde se encuentra la planta, cual remedo de los goteros. El control del agua aportada por este camino es menos eficiente que con los goteros auténticos.

Otro medio decisivo para mejorar la economía del agua agrícola es usar para el riego las aguas residuales urbanas. Es una práctica antigua, abandonada por las exigencias sanitarias, pero que puede ser recuperada si se adoptan las debidas precauciones para eliminar los patógenos persistentes. Utilizadas en bruto para regar hortícolas consumibles en crudo, son causa de enfermedades bien conocidas, como tifus, cólera, etc. Por ello, no se puede prescindir de un mínimo tratamiento depurador, aunque para algunos cultivos, como el maíz o el trigo, baste con mezclarlas con agua de lluvia en una proporción de 20 a 50%.

La OMS autoriza su uso sin restricciones siempre que no se sobrepasen los 1000 coliformes fecales por mililitro. Los tratamientos primarios convencionales de depuración del agua rebajan el contenido de coliformes desde 100 millones por mililitro hasta un millón, lo que es insuficiente, pero en los estanques de estabilización, se alcanza el límite recomendado por la OMS.

Como se sabe, se trata de unas balsas donde se retiene el agua residual entre 10 y 40 días, según su carga orgánica, experimentando una

doble depuración, aerobia en la superficie y anaerobia en la parte inferior. Es un sistema de mantenimiento económico, aunque costoso en espacio, pues se necesitan 30 hectáreas por cada 100.000 habitantes.

El riego con aguas residuales urbanas es un enfoque agrosanitario, que abrevia el ciclo de uso y consumo del agua. Israel utiliza el 70% de sus aguas residuales, parcialmente depuradas, para regar una 19.000 hectáreas, lo que ha permitido que la Agricultura ceda a las zonas urbanas el 38% de su cuota de agua. El beneficio es, pues, doble: mayor disponibilidad de agua urbana y aprovechamiento de los nutrientes agrícolas contenidos en las aguas residuales.

Y todavía he de citar otra vía para aumentar la eficiencia del riego, más en vanguardia que las anteriores, que consiste en la modificación genética de las especies para aumentar la proporción de fotosintato útil y disminuir la proporción de residuo. Hasta no hace mucho la proporción de semilla en los cereales no era superior al 20% de la planta; en la actualidad el índice de cosecha, de fotosintato útil, es superior al 50% para el trigo, arroz y maíz.

Y queda por comentar el ahorro en el ámbito urbano y doméstico. Aquí las medidas de ahorro son más problemáticas, pues dependen en buena parte de la concienciación ciudadana. Decía Benjamín Franklin (“El último Oasis. Sandra Postel. Ediciones Apóstrofe. Barcelona 1993) que “sabemos lo que el agua vale cuando el pozo se ha acabado”.

Las medidas de ahorro se concretan en homologación de equipos e incentivos económicos, apoyadas en campañas de información pública.

La homologación de equipos domésticos de bajo consumo, como cisternas, inodoros, duchas, lavadoras, lavavajillas, etc puede llegar a disminuir hasta el 30% del consumo. Las cisternas son los elementos de mayor consumo, no menos de 10-15 litros, y las que con mayor liberalidad se utilizan. En la actualidad se están homologando en México, las que usen no más de 6 litros.

En 1992 el consumo doméstico en USA era de 300l/ persona y día, pero un Decreto de aquel año obligó a bajarle, mediante la homologación de equipos domésticos, a 190 litros, es decir un 35%. En el periodo comprendido entre 1987 y 1991, los dispositivos de ahorro y las campañas de concienciación, lograron disminuir el consumo en Boston, un 20%. Es

decir, con este tipo de medidas se pueden conseguir disminuciones sensibles del consumo.

Yo creo que el tema el de los incentivos económicos no tiene especial interés en este marco, porque lo fácil es caer en la propuesta de una subida de tarifas, aspecto que puede ser incompatible con muchos criterios, incluidos los religiosos, pues el islamismo, por ejemplo, estima que el agua debe ser gratis ,y así sucede en buena parte del área musulmana. Sin embargo, no puedo dejar de referirme a un sistema implantado en algunos Estados USA conocido como *feebates*, palabra que procede de *fee* (multa) y *rebate* (prima o bonificación), que consiste en premiar la eficiencia y multar la ineficiencia.

Pero también los regidores municipales deben ahorrar. A ellos, además de sugerirles que estudien las posibilidades de ampliar las zonas verdes regables con aguas residuales parcialmente depuradas, hay remitirles al paisajismo *xerofítico* (*xeros*=seco), que consume de un 30 a un 80% menos de agua que los más tradicionales.

## 6. CONCLUSIONES.

Parece evidente que si la humanidad desarrollada mantiene el actual comportamiento en cuanto al derroche del agua, se terminará su sostenibilidad. Las Naciones Unidas, en el Documento de Evaluación de 1997, hablan de que dos tercios de la población mundial padecerán carencias entre moderada y alta dentro de 25 años. A ese ritmo, en el siglo XXII puede que esté comprometida toda la población mundial, lo que es una situación más grave que el previsible agotamiento del petróleo, pues éste podrá ser sustituido, pero el agua no.

De especial urgencia es dotar de agua a quienes carecen del mínimo vital, aunque sería un grave error que al mismo tiempo en que vayan consiguiendo la disponibilidad no se les eduque suficientemente para evitar que adquieran los mismos vicios derrochadores de las sociedades desarrolladas.

En paralelo, no después, por supuesto, son imprescindibles las medidas de ahorro, pero para su aceptación responsable hay que difundir,

hasta la reiteración, el conocimiento de lo que el agua significa en todo el entramado vital del planeta. El destino de los seres vivos, no sólo el del hombre, está ligado al agua. Se necesita concebir el agua como un patrimonio común, integrado en el amplio campo de la biosfera, y aceptar la premisa de que nuestras necesidades han de adecuarse a los imperativos ecológicos, de los que la especie humana también es partícipe.

En la Cumbre de la Tierra de Río de Janeiro, se dijo que “la escasez generalizada de recursos de agua dulce, su destrucción gradual y su creciente contaminación,.....exigen .....una ordenación integrada de los recursos hídricos”, solicitándose de los Estados y de las Naciones Unidas que para el año 2.000 establezcan programas eficaces de aprovechamiento del agua para lograr sistemas sostenibles.

¡Estamos a pocos meses del año 2000!, y tengo la impresión de las Naciones Unidas han dado un cierto avance con el Documento de Evaluación, que hay que aplaudir, pero que no es más que el prólogo para evitar situaciones críticas en el futuro.

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

---

**Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D.  
Rafael Cadórniga Carro**



EDUARDO RODRÍGUEZ ROVIRA  
*Vicepresidente Ejecutivo de la Fundación José Casares Gil*

*Excmo. Sr. Director  
Excmas. Sras. Y Excmos Sres. Académicos  
Señoras y Señores*

Es para mí. un honor, y en cierto sentido una satisfacción, aunque sea esta una ocasión luctuosa, dirigirme desde este estrado a todos Vds, para recordar al Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro como Fundador y primer Presidente de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia de Farmacia.

Mi contacto inicial con la Real Academia de Farmacia fue precisamente con el Profesor Cadórniga, cuando era Director de la misma, a través de Juan Manuel Reol. Como es natural nos conocíamos desde hace muchos años como consecuencia de nuestras respectivas actividades profesionales, pero era eso conocimiento más que amistad.

Rafael me expuso la intención de poner en marcha la idea original de los Académicos Otero y López Azcona de crear una fundación para establecer una relación más fluida entre la realidad cultural y científica de la Academia y el medio social y político en el que se desarrolla su actividad y con el que necesariamente tiene que convivir. Esa idea se había plasmado ya en un Acta de Constitución firmada ante el Notario de Madrid D. José Luis Álvarez el día 16 de Mayo de 1994 por los Académicos de Número Cadórniga, Doadrio, Segundo Jiménez, Portolés y Vian, pero faltaba todavía ponerla en funcionamiento, y Rafael Cadórniga me pidió que fuera yo quien se hiciera cargo de la función ejecutiva de la Fundación y en consecuencia ponerla a funcionar.

Todos conocíais a Rafael y su capacidad de trabajo y entusiasmo. Me convenció. Era un proyecto ambicioso y estimulante. Se trataba de vincular a la Real Academia de Farmacia., a través de la Fundación, a personalidades del mundo y la economía, de la Farmacia, de la Industria Farma-

céutica, del ámbito de la ciencia y la cultura; de establecer lazos de cooperación con el mundo de la Universidad; de fomentar y seguir los progresos que se produzcan en las ciencias y las tecnologías relacionadas con la farmacia y de mantener una estrecha colaboración con los centros de investigación y otras fundaciones científicas y culturales.

En realidad estos son los fines recogidos en el artículo 3º de los Estatutos de la Fundación y a ellos nos dedicamos desde el comienzo.

El Patronato que se constituyó, y que ha sido ya renovado, está formado por cinco académicos y por representantes cualificados de la Farmacia, la Distribución farmacéutica, la Industria farmacéutica y el mundo económico. La Fundación se convierte así en un Foro en el que concurren la Academia y las instituciones relacionadas con la farmacia en su sentido más abierto y la sociedad en general.

La Fundación inició su andadura colaborando con las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas organizadas en el 50 aniversario de la incorporación de la R.A.F. al Instituto de España, celebradas en Junio 1996. El excelente programa de las jornadas estaba ya cerrado gracias a la ingente labor desarrollada por el Académico Emilio Fernández-Galiano. A la Fundación le correspondió fundamentalmente dar la cobertura de Prensa y en palabras de Rafael en su discurso de clausura “ asumir, como su primer compromiso formal, apoyar y tutelar dicho proceso”. Su primer acto caía dentro de lo que los Estatutos establecían como su primera función, “impulsar y gestionar los proyectos que la Real Academia de FARMACIA. le proponga”

Recuerdo que el Prof. Cadórniga quedó muy contento con el resultado de las Jornadas y satisfecho con la colaboración de la Fundación, especialmente en las relaciones con la Prensa. Precisamente en ese mismo mes Enrique Granda y Luis Miguel Esteban publicaban un artículo en la Revista Jano, en el que decían “se diría que las Academias (de Farmacia) guardan un prudente silencio y no poco rubor a aparecer en los medios de comunicación y a promocionarse fuera de su ámbito”. Pues bien en el mismo acto de clausura de las Jornadas me correspondió a mí hacer la presentación de la Fundación y explicar su cometido. Quizás anticipándome a este comentario que todavía no conocía y recogiendo el sentir del propio Rafael Cadórniga, yo afirmaba que “ Es necesario desterrar una

infundada idea que considera a las Reales Academias como encerradas en sí mismas y desconectadas de la realidad, lo que trasmite una imagen de cierto aislamiento respecto al tejido social"...Las Reales Academias, como la de Farmacia, no se limitan a ser un arca donde se guardan los tesoros de la ciencia y la cultura"...sino que por su especial tarea histórica están en permanente contacto con las instituciones que tienen como fin, precisamente, el estudio y análisis de los acontecimientos que les atañen. Pero además las Reales Academias con talante vital y vanguardista son un foco que ilumina la actualidad, manteniendo una capacidad de análisis y discriminación al margen de sectarismos y modas"

Lo cierto es que se celebraron varias ruedas de prensa muy concurridas y aparecieron bastantes referencias de las Jornadas en los medios de comunicación. Recuerdo el comentario explícito de Rafael sobre su satisfacción por ello.

Uno de los aspectos quizá más interesantes del valor de la Fundación en relación con la Academia, es precisamente el que está haciendo más relevante la presencia de la R.A.F. en la sociedad, como piden nuestros Estatutos. No sólo por los anuncios de convocatorias o reseñas de actos que alcanzan la prensa especializada sistemáticamente, sino porque alcanzan lo que es más importante la prensa y medios generales. Las convocatorias que se difunden a varios miles de personas significadas, suponen que la Academia, cuyo nombre y escudo figura como se estableció desde el principio en todos los folletos, libros y publicidad de actos, se difunde entre los sectores afines y los medios periodísticos con más extensión que anteriormente. Esta fue una consigna dada por Rafael que se está cumpliendo.

Sería prolijo describir las actividades de la Fundación, que por otra parte son bien conocidas por la mayoría de los presentes. A partir de las Jornadas, la actividad de la Fundación fue incesante bajo la égida de Rafael Cadórniga y esta actividad ha proseguido con su sucesor Julio Rodríguez Villanueva desde que el día 12 de Febrero de 1998 es elegido Director de la Real Academia de Farmacia. y por tanto le corresponde ser Presidente de la Fundación..

.En la Comisión Ejecutiva de la Fundación, celebrada el 10 de Febrero de 1998 constó en acta lo siguiente: "El Profesor Cadórniga ha sido siem-

pre un eficaz impulsor del Patronato, bajo su mandato se ha cubierto una difícil primera etapa y su cordialidad fue siempre una constante. Se acuerda invitarle al próximo pleno para hacerle público el testimonio de gratitud”. Así ocurrió en el primer Pleno, presidido por el Profesor Rodríguez Villanueva y el Profesor Cadórniga en contestación al nuevo Presidente “expresó al Patronato su voluntad de seguir contribuyendo al quehacer de la Fundación que ha visto nacer y a la que ha dedicado esfuerzo y tiempo con absoluta entrega los años en que ha sido presidente”.

Efectivamente fue el creador y gran impulsor de la Fundación y, como prometió, hasta el final siguió colaborando con la misma, asistiendo a sus actos, participando de ponente, interviniendo en los coloquios.

Las palabras se las lleva el viento. El infierno está empedrado de buenas intenciones. Pero las obras quedan. Y una de sus obras, la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia de Farmacia, sigue en pie, con nuevo Presidente, nuevo Patronato.

Soy testigo de privilegio también de alguna de sus otras obras que ha dejado. El pasado mes de Diciembre tuvo lugar en el Ministerio de Sanidad y Consumo y presidido por el Sr. Ministro, un acto en su honor, a iniciativa del Instituto de Salud Carlos III, la Agencia Española del Medicamento y la Fundación Casares Gil. En dicho acto el Profesor Tamargo presentó la última obra que escribió el Prof. Cadórniga, “Interacciones Medicamentosas”, que tuve la oportunidad de patrocinar y editar, siendo Presidente de SB.

En aquella ocasión terminé mi intervención diciendo que aquel era mi homenaje a un gran profesional, un buen amigo, una excelente persona.

.Permítanme que como Vicepresidente Ejecutivo de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia de Farmacia, pueda repetirlo también ahora en homenaje de quien creó y puso en marcha la Fundación Casares.



## **Rafael Cadórniga: La huella del Maestro**

EXCMO. SR. D. ALFONSO DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ  
*Académico de Número*

*Excmo. Sr. Director*  
*Excmos Srs. Académicos*  
*Señoras y señores:*

Ha sido para mí un honor aceptar la representación de la Real Academia de Farmacia en este acto en memoria del que fue destacado miembro de esta Docta Corporación y su director entre 1991 y 1997, el Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro.

Durante los últimos meses hemos asistido a varios actos, algunos muy emotivos, en los que se destacaron las cualidades profesionales y humanas que adornaban la figura del Prof. Cadórniga. Para cuantos nos formamos a su lado y compartimos con él el trabajo de cada día, este reconocimiento es motivo de un legítimo orgullo y a la vez un compromiso con su aportación a la universidad española y a la profesión farmacéutica en el último medio siglo.

Glosar la figura de D. Rafael nos llena de tristeza y nos hace revivir los dolorosos momentos que siguieron a su inesperada desaparición. Pero volver la mirada al pasado también nos trae sentimientos entrañables de la vida universitaria con proyectos, aspiraciones, sueños cumplidos y sobre todo, agradecimiento.

No es mi intención resumir hoy la labor desempeñada por el Prof. Cadórniga en la Universidad y su proyección en la vida profesional. Relatar su “Curriculum Vitae” sería demasiado frío, ... a él no le gustaría. Quiero sin embargo destacar el impacto que nos causó a quienes fuimos sus discípulos, lo que aprendimos de él, lo que nos ha dejado, lo que debemos transmitir a quienes continúen nuestro trabajo. Me gustaría que él estuviera aquí, como hace pocos meses, cuando leía mi discurso de ingreso en esta Real Academia y podía disfrutar de los buenos momentos que le había dado su magisterio en la Universidad. Hoy, su sillón está vacío y

su recuerdo, como decía Flaubert no puebla su ausencia, la hace más grande.

Quisiera también no dejarme arrastrar por los sentimientos propios del discípulo que le debe cuanto es y lo que aún es más importante, cuanto quiso ser. Siempre decía D. Rafael que su prestigio era el de sus discípulos, entonces no entendíamos esta sentencia que atribuíamos a su insultante modestia. Ahora, transcurridos 30 años de una vida dedicada a la Universidad, ya entendemos aquel mensaje.

Conocí al Prof. Cadórniga en 1965, hace ya 35 años, cuando yo era un estudiante en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela. Como a muchos de mis compañeros la figura de D. Rafael nos cautivó desde el principio. Era como un soplo de aire fresco en el viejo caserón de Fonseca cuando próximos a finalizar nuestros estudios de licenciatura teníamos las primeras inquietudes sobre nuestro futuro profesional. El largo camino recorrido desde nuestra llegada a Santiago parecía ahora difuso y lleno de dificultades. La Facultad de Farmacia, anclada en el pasado, no podía y, sobre todo, no sabía dar respuesta al compromiso de formar farmacéuticos comprometidos con el cuidado y prevención de la salud. De aquella primera clase, cuando comenzaba a llover sobre Santiago, aún recuerdo, con impagable frescura, como él nos hablaba de una nueva Farmacia que se anunciaba entonces en las escasas publicaciones estadounidenses que llegaban a la Facultad en momentos de recordada penuria. Faltaban casi 20 años para la explosión de la información en la literatura científica internacional pero recuerdo a D. Rafael leyendo con avidez los primeros números del *Drug Intelligence Clinical Pharmacy*, una publicación entonces insólita en una Facultad todavía inmersa en el estudio de las ciencias de la Naturaleza.

Actualmente los analistas industriales tienen entre sus objetivos prioritarios definir lo que ellos llaman “core business”, el núcleo del negocio, para asegurar la calidad de sus productos y servicios. Hoy día, sí sabemos que el principal objetivo de una Facultad de Farmacia, su “core business”, es formar expertos dentro del campo de la terapéutica farmacológica, desde el área industrial, hasta el que se deriva de su utilización clínica. Rafael Cadórniga nos mostraba la verdadera identidad de lo que debería ser el ejercicio de la actividad farmacéutica en un futuro que ya es

presente. En este sentido es importante destacar su valiosa contribución en la modificación de los planes de estudios de Farmacia.

Este cambio en la forma de entender la Farmacia ilusionó a D. Rafael que supo entender desde un principio las enormes posibilidades que se abrían para el mundo universitario y para el ejercicio profesional. Ello fue posible gracias a una excelente formación en disciplinas básicas como la Biofísica y la Físico-Química apoyada en el rigor metodológico y en la evidencia experimental. Diez años antes, su maestro, el profesor Otero Aenlle, entonces catedrático de Físico-Química en Santiago y figura de especial recuerdo para esta Corporación, había iniciado a D. Rafael en el estudio de los fenómenos de superficie y en la físico-química de las monocapas lipídicas. Ello aportaba una valiosa información cuando Gerard Levy en EE.UU. acuñaba el término Biopharmaceutics, uno de cuyos principales objetivos era conocer la absorción gastrointestinal de los fármacos y los factores que la regulaban. En unos apuntes de clase, que aún conservo, D. Rafael nos hablaba en 1965 de conceptos tales como, disponibilidad fisiológica e inequivalencia terapéutica, se trataba de la primera aproximación que se produce en las Facultades de Farmacia en España a los problemas que se derivan de la utilización clínica de los medicamentos. Su formación en cinética química le había introducido primero en el campo de la estabilidad de medicamentos y posteriormente en la farmacocinética, a partir de los estudios de Torzen Teorell, biofísico sueco verdadero iniciador de esta disciplina en Europa. La Farmacocinética permitió a D. Rafael profundizar tanto desde el punto de vista conceptual como metodológico en el desarrollo de la Biofarmacia.

Esto solo era el inicio pero aún había que recorrer un largo camino lleno de dificultades. En 1968 se vio obligado a intervenir en la Junta de Facultad para explicar “aquellas cosas” que transmitía a sus alumnos de Farmacia Galénica y que muchos compañeros de claustro consideraban que se apartaba de la línea tradicional de las enseñanzas que impartía la Facultad. Algunos manifestaron que “aquello” debía ser de competencia exclusiva de los médicos y podría llegar a causar “problemas”. Se postuló incluso que la actividad profesional del farmacéutico finalizaba con la preparación y control de los medicamentos. ¿Qué pensarían ahora cuando después de 30 años nuestros alumnos estudian Fisiopatología, Biofarma-

cia y Farmacocinética, Farmacología y Terapéutica, Farmacia Clínica y Farmacocinética Clínica? ¿Cómo interpretarían las nuevas actividades de los farmacéuticos en la atención primaria, los hospitales o incluso en la propia oficina de farmacia? ¿Entenderían la corriente desatada por la Atención Farmacéutica entre los jóvenes profesionales?

En 1959, el entonces joven doctor iniciaba sus estudios sobre el efecto de los agentes tensoactivos en el rendimiento de la extracción de alcaloides de drogas vegetales. Sus conocimientos en ciencias básicas le estaban preparando de nuevo para desarrollar un trabajo apasionante surgido de una dificultad técnica inesperada en el desarrollo de las primeras experiencias; la formación de micelas coloidales. D. Rafael cambio su objetivo inicial al vislumbrar las posibilidades que se abrían en torno a la concentración crítica micelar que por entonces era lo primero que aprendían los estudiantes que iniciaban su trabajo en el departamento de Farmacia Galénica de la Universidad compostelana. En 1961 Rafael Cadórniga obtiene el premio de esta Real Academia de Farmacia por su trabajo “Formación de complejos entre agentes tensoactivos y alcaloides”. Estos estudios cristalizaron con el diseño de formulaciones de liberación modificada formadas por asociación entre tensoactivos aniónicos y medicamentos catiónicos. El Prof. Cadórniga incorporaba conceptos fisicoquímicos a la tecnología farmacéutica para modular la respuesta terapéutica mediante cambios en el perfil biofarmacéutico. Representaba el cambio, como decía él del “hágase según arte” de las viejas recetas al “hágase según ciencia”. Eran las primeras experiencias en el diseño de “Drug Delivery Systems” o formulaciones de liberación modificada. Son los avances de la formulación farmacéutica moderna que constituyen un área fundamental, por ejemplo, para la administración de péptidos y proteínas en la utilización de vacunas, hormonas, inmunomoduladores, etc. obtenidos por Biotecnología.

En una de sus publicaciones, a finales de los años 60, Cadórniga discute, por primera vez, en la bibliografía española el significado del término “availability” al que diversos autores estadounidenses daban la máxima importancia por ser responsable, en definitiva, de modular la respuesta de los principios activos. Él introduce por primera vez el término disponibilidad transformado posteriormente en disponibilidad fisiológica y fi-

nalmente en biodisponibilidad cuyo significado llega a todos los rincones del mundo sanitario en nuestros días con la introducción de los medicamentos genéricos, una decisión de la Administración Sanitaria apoyada en un concepto básico de calidad farmacéutica: la bioequivalencia.

Rafael Cadórniga hace un análisis crítico del concepto de biodisponibilidad desde su relación con los estudios de velocidad de disolución hasta su aplicación en la predicción de la respuesta terapéutica. En este sentido llega a plantear una relación entre parámetros farmacocinéticos y respuesta cuando apenas se habían esbozado las relaciones farmacocinética-farmacodinamia que constituyen hoy día un objetivo prioritario en el desarrollo de nuevos medicamentos. Esta relación se apunta como de gran utilidad en la planificación de la dosificación individualizada de medicamentos que ampliaría sus expectativas, poco después, con la introducción de la monitorización de fármacos. En 1972 inicia con el Prof. Peña Guítan, entonces catedrático de Pediatría en la Universidad de Santiago, un programa dirigido al estudio de la farmacocinética de Fenobarbital en niños. Según comentaba el ilustre pediatra, este tipo de estudios se estaban realizando en el Children's Hospital de Boston, que había visitado recientemente, y era notable su contribución en la mejora de resultados en el tratamiento de niños epilépticos. D. Rafael planificó las pautas de dosificación de fármacos antiepilépticos, en base a criterios farmacocinéticos, mucho antes de que se convirtiese en una práctica habitual en el control de los tratamientos realizada en centros especializados. Rafael Cadórniga señala también entonces la importancia de la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos y concretamente de la biodisponibilidad. Esta variabilidad, cuya repercusión clínica fue reconocida recientemente, ha permitido explicar los fracasos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas con agentes antimicrobianos, el rechazo en pacientes trasplantados tratados con inmunosupresores o la pérdida del control de la presión arterial en el tratamiento con fármacos antihipertensivos. Sus aportaciones en este campo se producen con anterioridad a los enunciados de Sheiner en la Universidad de San Francisco que permitirían posteriormente el desarrollo de la Farmacocinética de poblaciones.

Dentro de pocas semanas acudirán a Salamanca más de 150 expertos internacionales en esta disciplina pertenecientes al Population Ap-

proache Group of Europe para celebrar su IX Congreso. Entre sus objetivos figuran los avances metodológicos de la farmacocinética de poblaciones aplicables al desarrollo clínico de nuevos medicamentos en un intento de mejorar su rendimiento terapéutico. Que lejos nos parece ahora aquellos primeros contactos con la Farmacocinética cuando cada día aprendíamos algo nuevo y todo eran expectativas y sorpresas.

El Prof. Cadórniga fue pionero en el desarrollo de la Biofarmacia y Farmacocinética en España y esta aportación ha sido reconocida en todo el ámbito sanitario como recordaba, con especial sensibilidad, en un acto recientemente celebrado en el Ministerio de Sanidad y Consumo uno de sus buenos amigos, el ilustre farmacólogo y destacado miembro de esta Real Academia, el Prof. Juan Tamargo Menéndez. En 1984 el Prof. Cadórniga recibía la medalla de honor del Scientific Committee of European Congress of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics en reconocimiento a sus importantes aportaciones que forman ya parte en la historia de estas disciplinas.

En 1970 el Prof. Cadórniga inicia una serie de publicaciones con el sugestivo título: “La formulación, factor condicionante de la eficacia terapéutica” donde escribía *“Hasta hace pocos años, la formulación de un medicamento, en determinada forma de dosificación, se supeditaba exclusivamente a sus propiedades extrínsecas evaluadas por ensayos “in vitro” sin tener en consideración su capacidad de absorción, la distribución y la eliminación que son factores fundamentales en la eficacia terapéutica”*. Por ello Cadórniga define a la forma farmacéutica como *“el producto resultante del proceso tecnológico que confiere al medicamento las condiciones adecuadas para su administración, correcta dosificación y eficacia terapéutica”*. Poco antes Campagna citaba el caso de un paciente que evolucionaba favorablemente a un tratamiento con prednisona. En el curso del tratamiento sustituye los comprimidos que estaba tomando por otros, también de prednisona, con igual contenido en principio activo y siguiendo el mismo régimen de dosificación, produciéndose una interrupción en la evolución favorable del proceso, el cual se renueva cuando se vuelve a recurrir a la formulación inicial. Era una clara expresión de los problemas que se derivaban de la inequivalencia terapéutica. Al referirse al papel de los excipientes Cadórniga señalaba *“no se trata de simples*

*soportes materiales que facilitan la administración de los principios activos, es necesario que no afecten a la actividad terapéutica (compatibilidad y estabilidad) ni a la biodisponibilidad*". Ello le lleva a estudiar el envejecimiento de las formas de dosificación de medicamentos así como sus consecuencias llegando a acuñar el término "caducidad biofarmacéutica" asociada a un descenso de la biodisponibilidad sin que la integridad química de los principios activos se viera afectada. Al analizar los factores tecnológicos, fisiológicos y patológicos que pueden modificar la biodisponibilidad Rafael Cadórniga, sentencia, aplicando la conocida expresión de Ortega y Gasset: "el medicamento no es sólo él, es él y sus circunstancias"

Rafael Cadórniga fue, sobre todo, un profesor universitario. Creyó en una idea, tenía capacidad para desarrollarla, ilusionó a un grupo de investigadores, impulso un objetivo común y creó una escuela. Su trabajo justificó su vida universitaria y forjó su capacidad de lucha por todo aquello en lo que creía y que transmitía a cuantos estábamos a su lado. Era, en palabras de Nietzsche, una piedra en el estanque de nuestra vida, el círculo reducido iba creando ondas cada vez mayores. El Prof. Cadórniga volcó su generosidad especialmente hacia sus discípulos muchos de los cuales ejercen hoy cargos de responsabilidad en diferentes áreas del mundo sanitario. No es posible citarlos a todos pero algunos de ellos tienen especial protagonismo tanto por ser los iniciadores de su escuela como por su propio prestigio profesional. Entre ellos figuran el Profesor Vila Jato, Catedrático de la Universidad de Santiago, la Profesora Berta Cuña, Jefa del Servicio de Farmacia del Hospital Juan Canalejo de la Coruña, y actualmente Directora General de Farmacia de la Xunta de Galicia, el Dr. Isaac Arias, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Xeral de Vigo, el Profesor Matías Llabrés, Catedrático de la Universidad de la Laguna, el Profesor Jiménez Torres, Catedrático de la Universidad de Valencia y el Dr. Jose Luis Lastres, Catedrático de la Universidad Complutense. Sus enseñanzas se transmiten hoy en 7 facultades de Farmacia en España (Complutense, Santiago de Compostela, Salamanca, Barcelona, La Laguna, País Vasco y Valencia) en las que ya se ha incorporado una segunda generación de discípulos como profesores universitarios. Muchos son ya destacados especialistas de reconocida valía en el campo de la Tecnología Farmacéutica, la Biofarmacia y la Farmacocinética. Son aquellos farma-

céticos en quien D. Rafael pensaba en los años 60, los que dan prestigio a la profesión y son orgullo para sus maestros. Todos deben saber que un día fueron solo una ilusión nacida allí donde termina el más grande de los caminos de la vieja Europa.

La actividad docente de D. Rafael en hispanoamérica se incrementó notablemente durante los últimos 15 años, especialmente en las universidades de Chile y Argentina. Para el Prof. Aquiles Arancibia, director del Departamento de Ciencia y Tecnología Farmacéutica en la Universidad de Santiago, el Prof. Cadórniga ha sido un científico ilustre y un compañero entrañable que contribuyó decisivamente al desarrollo de la Biofarmacia y Farmacocinética en Chile. Rafael Cadórniga fue designado miembro honorario de la Academia de Ciencia Farmacéutica de Chile, de la Academia Argentina de Bioquímica y Farmacia y de la Academia Iberoamericana de Ciencias Farmacéuticas.

El magisterio del Prof. Cadórniga sobrepasó las aulas y laboratorios de la Universidad. Sus conocimientos sirvieron de impulso a una especialidad farmacéutica que progresaba a pasos agigantados; la Farmacia Hospitalaria. Su prestigio profesional le llevó a ocupar en 1966 la Presidencia de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Sus contactos con la industria farmacéutica nacional e internacional fueron constantes. El Prof. Cadórniga era particularmente apreciado por su amplia visión del complejo mundo de los medicamentos y por su profundo conocimiento en Tecnología Farmacéutica y en Terapéutica adquirido éste a través de una larga experiencia hospitalaria. Son importantes, también, sus servicios a la Administración Sanitaria durante más de 40 años, hasta que en 1995 fue elegido por unanimidad Presidente de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española. Culminaba así, una prolongada carrera dedicada a la enseñanza universitaria, a la investigación científica y a la asistencia sanitaria. El Excmo. Sr. Ministro de Educación y Cultura otorgaba el pasado mes de Julio al Prof. Cadórniga su última distinción, la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio, con el reconocimiento de la sociedad a quien tan magistralmente sirvió.

Rafael Cadórniga había sido respetuoso con la trilogía de funciones atribuidas a la Universidad que definen, con precisión, su esencia: crear ciencia, transmitir ciencia y aplicar ciencia. Es la huella del maestro.

Permitidme finalmente dirigir unas palabras a quienes realmente compartieron su vida, a la Excma. Sra. D<sup>a</sup> Irene Valiño y a los hijos y familiares de D. Rafael que nos acompañan en este acto. Quienes nos formamos a su lado hemos contraído con vosotros una deuda permanente, nuestro tiempo era parte del vuestro, nuestras preocupaciones y contrariedades aparecieron como intrusos en vuestra familia, en definitiva os quitamos un poco de D. Rafael. Todos deseamos que la tristeza que os acompaña sea mitigada por el orgullo que debéis sentir de haber vivido junto a un hombre excepcional, científico ilustre, amigo entrañable y un ejemplo a seguir para aquellos jóvenes universitarios que acuden cada día a nuestras aulas.

Muchas gracias.



## **"Rafael Cadórniga Carro, Académico y Director"**

EXCMO. SR. D. ANTONIO PORTOLÉS ALONSO  
*Académico de Número*

*Excmo. Sr. Director,*

*Excmo. Sr. Presidente del C.S.I.C.*

*Excmos. Sras y Sres. Académicos,*

*Ilmos. Sras y Sres.*

*Sras. y Sres. Familiares y Amigos del Prof. D. Rafael Cadórniga:*

En la sesión de esta tarde, triste jornada en la que todos participamos, nuestra Corporación ha querido rendir un singular y público homenaje a la memoria del que fue uno de sus miembros distinguidos y Director de esta Corporación durante varios años.

En la primera intervención, el Dr. Eduardo Rodríguez Rovira, nos ha dado a conocer la positiva labor del Prof. Cadórniga en la creación, puesta en funcionamiento y desarrollo de la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia que, durante unos cuantos años antes, no había logrado ser más que el esbozo de un proyecto de no fácil realización. Seguidamente, la intervención del Prof. Domínguez Gil-Hurlé, miembro de esta Corporación, nos ha llevado de la mano por la extensa biografía que pone de manifiesto la extraordinaria personalidad docente y científica de su maestro el Prof. Cadórniga; su exposición, con la minuciosidad de un hombre de laboratorio y el calor de su amistad, ha demostrado claramente que a quien hoy aquí recordamos, nuestro querido compañero Rafael Cadórniga, realizó una fecunda labor en el desarrollo de la Farmacia Galénica, aplicando sus muchos conocimientos de Físico-Química al campo de la cinética y "biodisponibilidad" de medicamentos, término este último que junto con el de "bioequivalencia" fueron acuñados

e introducidos en el léxico farmacológico por el propio Prof. Cadorniga, siempre preocupado por el empleo correcto del castellano, costumbre que quizá se iniciara en su juvenil paso de estudiante de Bachillerato por las ciudades de León y Valladolid, firmes bastiones del buen decir castellano.

Esta extraordinaria ejecutoria profesional, tanto en la enseñanza como en la investigación de una avanzada y moderna Farmacoterapia, lógicamente habría de conducirle a participar en tareas académicas. No es de extrañar, por tanto, que los Doctores Otero, Doadrio y Mosqueira, en 1.981, presentaran su candidatura a una vacante de Académico Numerario en esta Institución en la que se amalgaman tan distintas corrientes investigadoras: desde la Química a la Biología, pasando por la Terapéutica, y acompañándose también, de la Genética y la Biotecnología, aplicables, todas ellas, a esa Ciencia del Medicamento en la que el Dr. Cadorniga ya resultaba ser un ejemplar y aventajado especialista por todos reconocido y cuyo bagaje científico habría de venir a potenciar las actividades de la Tercera Sección de la Academia, dedicada al estudio y desarrollo científico de la Farmacología y Farmacotécnica.

Parece lógico que sea yo, su colaborador en tareas rectoras de nuestra Corporación durante el periodo en que actuó como Director, el encargado de recordar su paso por esta Real Academia de Farmacia y así me dispongo a hacerlo recordando, en primer lugar, aquella sesión a la que asistí como Académico Correspondiente: era la tarde del 14 de Abril de 1983, cuando el Prof. Cadorniga Carro leyó su preceptivo discurso de ingreso en esta Corporación bajo el título de *"Vigencia de la Educación Farmacéutica. Posible proyección hacia un futuro"*; fue contestado por el Prof. Otero Aenlle, el entonces Vicedirector de esta Academia y considerado por el recipiendario como su maestro y guía desde sus tiempos de universitario en la Cátedra de Físico-Química en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela y con el que, más tarde, mantendría una eficaz colaboración científica que habría de terminar en entrañable amistad.

El discurso constituyó una verdadera lección magistral sobre actividades medicamentosas en relación con los problemas de equivalencia o inequivalencia, biológica y terapéutica, y con otros muy diversos factores entre los que destacan la solubilidad, absorción y caducidad, que el

Farmacólogo debe ponderar y utilizar o excluir con el fin de que el medicamento alcance con óptima actividad su objetivo en el organismo y a los que el autor consideraba incluidos dentro del término de "bioequivalencia" y al que tantas veces se ha referido en su Cátedra. También se ocupaba en este trabajo de lo que entonces constituía la frontera de la investigación farmacológica, como era el diseño y empleo de portadores medicamentosos de acción selectiva, ya fuera en forma de nanopartículas, de liposomas en estado paracrystalino, de membranas de eritrocitos o de otros elementos celulares, capaces de producir en el organismo una correcta respuesta biológica. En todo el estudio pudo apreciarse, además, su preocupación porque el Farmacéutico recibiera una formación humana, científica y profesional adecuada, con posibilidad de conseguir una preparación actualizada de conocimientos que mantuvieran viva y dinámica su actividad profesional. Terminó su disertación reclamando a los docentes, a los compañeros, a las autoridades sanitarias y a la sociedad en general un examen de conciencia que hiciera posible este comportamiento.

El Prof. Cadórniga, durante su permanencia como Académico Numerario, fue un asiduo asistente a las sesiones científicas con destacada intervención en las discusiones y comentarios sobre los temas más diversos. Le recuerdo con su fácil y preciso don de palabra preocupado por defender, en los laberínticos tecnicismos de la Ciencia, el correcto uso de nuestro idioma para que las traducciones fueran siempre un fiel reflejo de la realidad científica española. Su dinamismo y capacidad de trabajo, vestidos de una aparente tranquilidad en su cordial saber estar, nunca le permitieron dejarse tareas sin terminar, ni excusarse de otros trabajos "extra" que pudieran llegarle y que con seguridad le iban a restar tiempo de su descanso y disfrute convivencial en familia. Por eso, en este recuerdo del transcurrir de la vida académica de nuestro compañero Rafael, es de justicia mencionar también a la persona que le proporcionaba esa hogareña tranquilidad y sosiego, que tan necesarios son para mantener la creatividad, especialmente en lo científico y cultural. A ella, a su esposa, Dña. Irene Valiño, que también fue una sobresaliente compañera en la profesión farmacéutica, hemos de reconocer aquí su ejemplar colaboración con el que de una forma inesperada, en poco tiempo, y con la serenidad que le caracterizaba, nos abandonó para siempre; por ello, a mi vez, quiero

recordarla que *en esta casa siempre tendrá otra familia, la gran familia académica, donde siempre será bien recibida.*

En cuanto al nombramiento de Director, queda explícitamente indicado en la Memora Académica correspondiente, que en Diciembre de 1991, *"al cumplirse el plazo para la renovación reglamentaria de cargos, el Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro resultó elegido Director de esta Academia para ocupar la vacante dejada por el Excmo. Sr. D. Angel Santos Ruíz"*; cargo en el que fue reelegido tres años más tarde, para continuar en este puesto hasta el mes de Febrero de 1998 en que al efectuarse otra preceptiva renovación fue sustituido por el actual Director que hoy nos preside, Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. Esta continuada permanencia del Dr. Cadórniga en su cargo de Director le ha valido el merecido honor de que su imagen al óleo, pintada por su paisano Carlos López Boano, figure perdurablemente en nuestro salón de sesiones científicas junto a otros Directores de esta Real Academia de Farmacia, formando parte así de nuestra galería de Farmacéuticos ilustres. Esta galería, que si bien es modesta en cuanto al número -pues sólo son seis los miembros que la integran-, es grande en cuanto a las aportaciones al conocimiento de las Ciencias Farmacéuticas efectuadas por los personajes que en ella figuran.

Si continuamos nuestra reflexión sobre tan interesante galería, podremos comprobar la circunstancia de que la mitad de sus miembros (Dres. Casares, Montequi y Cadórniga) vieron sus primeras luces en las brumosas, fecundas y entrañables tierras de Galicia; así mismo, aunque sólo sea "in mente", nos atrevemos a formar una *"ampliada galería virtual"* añadiendo a ella la labor de otros ilustres galaicos como el Dr. Carracido, que de no haber muerto antes de la creación de la Academia Nacional de Farmacia (Institución que precedió a la nuestra actual), también figuraría junto a los anteriores; y al Dr. Otero, que perteneció al equipo rector de esta Academia como Vicedirector desde 1.977 hasta el 31 de marzo de 1.992 en que falleció. Ello nos lleva a elucubrar sobre la posibilidad de que se hubieran establecido indisolubles lazos de hermandad entre el histórico palacio santiagués de Fonseca, donde todos ellos iniciaron su formación universitaria, y el noble edificio académico de Madrid que hoy nos acoge, al que también todos ellos llegaron después de un largo periplo como

docentes, estableciendo amplias rutas de circunnavegación por las Ciencias Farmacéuticas desde las postrimerías del siglo XIX hasta finales del XX. Tengo para mí, que se ha cumplido el deseo tímidamente formulado por el Dr. Cadórniga al terminar su discurso de ingreso en la Real Academia de Doctores, en el que parece reclamar un puesto de preferencia a la cálida sombra de dos de estos Académicos -Carracido y Casares- que le precedieron formándose en la antigua Facultad de Fonseca, ..... *querido Rafael, ya podrás estar tranquilo, porque seguro estoy de que, a juicio de todos, lo que formulaste como deseo el 11 de Mayo de 1.994 ya lo habrás visto cumplido, pues para ello sobrados méritos hiciste.*

Durante su periodo como Director es de resaltar que su método de trabajo fue siempre en equipo, y con una perfecta coordinación dentro de la Comisión Permanente de Gobierno, cuyo recuerdo me hace sentir nostalgia por aquellas frecuentes reuniones en las que Director, Secretario y Tesorero siempre estábamos de acuerdo. En aquellos tiempos, la Academia hubo de realizar visibles cambios, como fue la recuperación del espacio colindante ocupado por el Instituto de Toxicología; con ello se pudo ampliar la superficie dedicada a Museo y se crearon nuevas salas para reuniones y sesiones científicas; así, cuando se celebró el famoso "Día de Puertas Abiertas" en el año 92, en este recién remodelado edificio -que fue muy visitado- se recibieron bastantes felicitaciones y pudo causar verdadera admiración entre muchos habitantes del barrio que, entonces, pudieron conocer los "ocultos encantos" del recinto con el que habían mantenido una prolongada vecindad.

Por otra parte, el aumento progresivo de los ingresos permitió realizar mayor número de actividades y celebrar algún congreso de carácter internacional, en tanto que se iban acumulando trabajos "extra" como el derivado de la entrada en funcionamiento de la Fundación "José Casares" de Amigos de la Real Academia de Farmacia; lo cual, fue a recaer particularmente sobre el Prof. Cadórniga, cuya actividad académica se vió, además, incrementada con la reactivación de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española y Formulario Nacional a cuyo frente figuraba; "item mas" la preparación del discurso de inauguración correspondiente al año 93 y del que no le pareció correcto evadirse, pese a sus muchas actividades. En este trabajo, titulado "*El Universo del Medicamento*", volcó

muchos de sus conocimientos y teorías sobre Biofarmacia y Farmacocinética, consiguiendo resaltar el carácter multidisciplinar e interdisciplinar de las Ciencias Farmacéuticas aplicadas a la génesis, preparación y desarrollo de un nuevo fármaco. El Prof. Cadórniga, en su condición de Director, también será recordado siempre por todo el personal que trabaja en esta Academia, como una persona de amable trato, con una incansable laboriosidad y manteniendo la firme autoridad de su cargo sin que se hiciera notar.

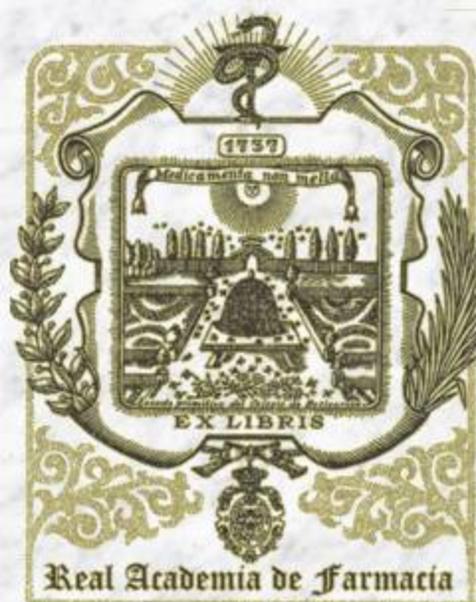
La personalidad académica del Prof. Cadórniga no quedó circunscrita a los límites de nuestra Corporación, sus muchos saberes científico-culturales habrían de ser reclamados, también, por otras Instituciones y así fue distinguido con otros nombramientos de Académico en España, siendo Miembro Numerario en la Real Academia Nacional de Medicina (1988) y en la Real Academia de Doctores (1993), así como Académico de Honor de la Academia Ibero-Americana de Ciencias Farmacéuticas (1995); también ha sido Miembro Honorario de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile (1988) y Académico Honorario de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica (1944); y finalmente, por ser su última distinción académica internacional, también ha sido distinguido con el título de Miembro Correspondiente de la German Pharmaceutical Society, según aprobó su Comité Central el pasado 27 de Sep. Es probable que trámites legales, interrumpidos en el periodo vacacional, hicieran que esta noticia no pudiera recibirla en vida el Dr. Cadórniga; por ello, la entrega del correspondiente Diploma, habrá de hacerse a título póstumo, coincidiendo con algún acto académico sobresaliente.

Por sus aportaciones científicas, básicas y aplicadas, al campo de la Biofarmacia, recibió numerosos Premios, Medallas y distinciones de las que tan sólo citaremos aquí la más sobresaliente, concedida por Real Decreto de 25 de Junio del pasado año, la Gran Cruz de la Orden Civil de Alfonso X El Sabio y cuya entrega, por su lamentable ausencia que hoy aquí nos reúne, hubo de hacerse a título póstumo, entregando la Condecoración a su esposa en la Sesión Solemne de Apertura de Curso el pasado 20 de Enero.

Finalmente, no quisiera terminar esta Sesión, sin expresar mi homenaje personal al excelente compañero y amigo que siempre fue, desde que nuestros diferentes senderos de investigación se cruzaran en reuniones científicas internacionales organizadas por la Sociedad Mediterránea de Quimioterapia. Para mí fueron características de la hombría de bien de Rafael Cadórniga su amplia humanidad rebosante de cordialidad, su ocurrente inteligencia y el que siempre mantenía una actitud consecuente entre lo que pensaba, lo que decía y lo que hacía; nunca regateaba su saber ni su afán por despertar curiosidades y cumplió a la perfección con la parábola de los talentos: lo que recibió, lo aplicó y multiplicó en bien de los demás, fue excelente Director y buen compañero al que desde aquí, resignadamente, siempre recordaremos con respeto y afecto: ..... *Rafael Cadórniga, descanse en paz.*







MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA

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