

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2002

VOLUMEN LXIX

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

La Bromatología en el tiempo y en la Obra de Sevet

BERNABÉ SANZ PÉREZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Catedrático Emérito de la Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN

Miguel Servet, médico y teólogo español, nacido en pleno Renacimiento, fue un genuino representante de su tiempo. Dotado de una gran cultura, hablaba correctamente latín, griego y hebreo y se expresaba perfectamente, además de en español, en alemán, francés, italiano y catalán.

Estudió, entre otras, en las universidades de Toulouse, Lyon, París, Estrasburgo y Basilea, en donde contó con el respeto y la amistad de muchos de sus profesores y colegas y con el odio de otros. Sus ideas heterodoxas, que lo enfrentaron a católicos y protestantes, determinaron que fuera condenado por hereje, tanto por unos como por otros, y que finalmente los seguidores de Calvino, tras un proceso ignominioso y lleno de contradicciones, lo ejecutasen en la hoguera en Champel, un suburbio de Ginebra.

En esta revisión nos referimos únicamente a sus contribuciones a la Medicina — resaltando especialmente su descubrimiento de la circulación pulmonar de la sangre— y a la Ciencia de los Alimentos. Primero estudiamos la influencia que en su formación tuvieron los grandes médicos greco-romanos clásicos (sobretudo Galeno), los árabes y sus profesores y compañeros renacentistas, como Champier, Andernach, Silvio, Veralio, etc. Por último se analizan con detalle las ideas bromatológicas de su libro *Syruporum* y de algunos escolios de su traducción de la *Materia medica* de Dioscórides.

Palabras Clave: Servet, Renacimiento, Bromatología, Syruporum, Jarabes.

SUMMARY

The Food Science at the time and in the Servetus' books

Michael Servetus, Spanish physician and theologian born at the middle of Renaissance was a genuine representative of his time. Having an encyclopaedic culture he

was fluent in Latin, Greek and Hebrew and spoke correctly German, French, Italian and Catalanian.

Servetus was enrolled in several European universities among them Toulouse, Lyon, Paris, Strasbourg and Basel, where he was a respected and distinguished intellectual for the greater part of the community. However some people disliked his unorthodox views and theories and his teachings led to his condemnation as a heretic by both Roman Catholics and Protestants and to his execution by Calvinists from Geneva. John Calvin had once declared that if Servetus ever came to Geneva he would not allow him to leave alive. The persecution instigated by Calvin was ignominious and disgraceful, and Servetus was found guilty of heresy and burned alive at Champel near Geneva.

In this review only the Servetus contributions to Medicine – with special citation of his discovery of pulmonary blood circulation- and to Food Science are studied. Attention is also paid to the influence of the classic Greek-Roman physicians (mainly Galenus), the Arabic ones and to the Servetus' professors and colleagues; Champier, Andernach, Sylvius, Versalio, etc. Finally the theories of Servetus on the different types of syrups and on their preparation and uses – as described in the Syruporum- are analysed.

Key words: Servetus, Renaissance food, Food Science, Syruporum.

1. Introducción

Miguel Servet nació en un tiempo de cambio en el que España, recién terminada la Reconquista con la toma de Granada e iniciada la colonización del Nuevo mundo, reclama su papel de gran potencia.

El Renacimiento es un tiempo de aventuras, de descubrimientos y exploraciones de nuevas tierras en el que se sustituye la astronomía de Copérnico por la de Ptolomeo y en el que una sucesión de descubrimientos (papel, imprenta, pólvora, etc) permitirán pasar del largo periodo oscurantista del Medioevo a un verdadero renacer del pensamiento en general. En el aspecto científico se busca una nueva interpretación de los fenómenos naturales y en el filosófico una explicación racional, realista y humana del papel del hombre en el universo.

Servet vivió y murió violentamente en ese mundo cambiante en el que la vuelta a los saberes clásicos se acompañaba de un despertar vigoroso de todas las formas del pensamiento humano. Fue un genuino repre-

sentante del hombre renacentista. Dotado de una inteligencia privilegiada, en su búsqueda constante de la verdad, se vio envuelto en más polémicas de las que hubiera deseado, pero tampoco dudó, cuando lo creyó justo, en contradecir a sus maestros y en defender, hasta con su vida, lo que él consideró la regeneración del verdadero cristianismo.

En las páginas que siguen no se tratará de sus conocimientos filosófico-teológicos, tema que por razones obvias supera mis pobres saberes, sino que me limitaré a ciertos aspectos de su obra relacionados con la Bromatología.

1.1 Antecedentes greco-romanos

Los conocimientos médico-nutritivos de la Edad Media y del Renacimiento se basaban en el pensamiento de los grandes maestros greco-romanos, como Dioscórides, Hipócrates, Celso, Galeno y sus discípulos. Admitían que el mundo natural, incluida la especie humana, estaba formado por cuatro *elementos*: Aire, agua, fuego y tierra. Cada elemento poseía una *calidad* característica; así la tierra era seca, el agua húmeda, el fuego caliente y el aire frío. Cuando se combinaban dos elementos y se mezclaban sus cualidades se originaban *complexiones* (o lo que es igual, temperamentos), a las que correspondían cuatro *humores* distintos, como se recoge en el siguiente cuadro:

Complexión	Calidad	Humor
Sanguínea	Caliente y Húmeda	Sangre
Flemática	Fría y Húmeda	Flema
Colérica	Caliente y seca	Bilis amarilla
Melancólica	Fría y seca	Bilis negra

La complexión determinaba el aspecto y características del individuo. Sin embargo, podía modificarse por un exceso de otro humor. Así, una persona de temperamento sanguíneo podía volverse melancólica si se producía, por cualquier causa, un exceso de bilis negra que, por cierto, pensaban que se originaba en el bazo.

Creían, asimismo, que todos los alimentos se componían de los cuatro elementos citados y que su digestibilidad y valor nutritivo dependían exclusivamente de sus correspondientes calidades. Pensaban, por ejemplo, que la carne de cordero era muy húmeda y flemática y por lo tanto, no recomendable para los ancianos cuyos estómagos se suponía que contenían demasiada flema. Clasificaban los alimentos atendiendo a los grados o cantidades que poseían de las cuatro cualidades; por ejemplo, la lechuga era fría y húmeda y las coles calientes en primer grado y secas en segundo. La dieta incluía no solo el conjunto de alimentos ingeridos, sino también todas las medidas higiénicas y terapéuticas que debían observarse. Sus conocimientos nutritivos se establecían mediante razonamientos lógicos: Puesto que creían que los niños eran de complexión flemática, esto es, húmeda y fría, era lógico que no pudieran alimentarse con productos calientes y húmedos, como el vino y la carne, que calentaban y humedecían demasiado el organismo. Afirmaban que con el transcurso del tiempo los niños se hacían más sanguíneos o coléricos. Por ello, superados los 14 años, podían comer carnes con más sustancia, más frías y húmedas; también les estaban permitidas las ensaladas de hortalizas frescas y el tomar de tarde en tarde vino, a no ser que se le hubiera adicionado una cantidad prudencial de agua en cuyo caso podía beberse a diario. En la ancianidad, al disminuir el calor natural y la fuerza corporal, se recomendaban las carnes calientes y húmedas. Como puede apreciarse esta doctrina era una mezcla curiosa de observación, filosofía y empirismo.

Como señala con acierto Rhodes (1985), los monjes de los monasterios, que fueron de hecho casi los únicos estudiosos de la Edad Media, se limitaron a copiar y conservar los trabajos de la antigüedad clásica, comentándolos y corrigiéndolos en traducciones cuya veracidad no se molestaron en comprobar. Los escolásticos estaban convencidos de que todo lo valioso ya había sido descubierto y ofrecido en los libros a la posteridad. Creían que su deber consistía en aprender y explicar los libros antiguos, conservándolos más o menos intactos. De aquí la influencia de Galeno cuya filosofía del cuerpo, de la muerte y del alma resultaba aceptable para la Iglesia en desarrollo.

1.1.1 Los grandes maestros

Desde el siglo V a. de C. y gracias a las observaciones y juicios de muchas personas, algunas de ellas anónimas, fueron incorporándose las tradiciones de las civilizaciones asiria, egipcia y otras al acervo cultural griego, a la vez que en la Grecia clásica fue creándose un cuerpo de doctrina, sobre la salud del hombre y de los animales que, recogido por algunos escritos, se transmitiría a las futuras generaciones. Aunque fueron bastantes más los griegos y romanos que escribieron de medicina, citaremos únicamente a cuatro.

Hipócrates, que nació en el 460 a.C y vivió 83 años, fue llamado con razón el padre de la medicina, escribió un conjunto de tratados sobre nutrición, medicina, ciencias naturales y veterinaria cuya impronta marcaría las medicinas romana, arábiga y renacentista.

Dioscórides Pedanus, griego de nacimiento, vino al mundo en el siglo I de la Era cristiana en Anazarba de Cilicia, de aquí el sobrenombre de Anazarbeo. Fue médico de las legiones de Nerón y un gran estudioso y observador de la naturaleza; dominaba, además de la medicina, la botánica y la mineralogía de su tiempo. Conocedor de la obra de Hipócrates, en su tratado *De materia médica* incluye unas 600 especies de plantas de las que describe sus virtudes curativas, efectos tóxicos y antídotos, forma de administrarlas, indicaciones y en muchos casos importancia nutritiva. Sin duda alguna, hasta el siglo XVIII fue, junto con la Biblia, el libro más traducido.

Aulus Cornelius Celsus, que también vivió en el siglo I de nuestra era, fue un gran médico que dominaba todo el saber científico de su tiempo. Siguiendo a Hipócrates era partidario de no atacar a la enfermedad directamente sino de esperar un poco para que la *vis medicatrix naturalis* (fuerza curativa de la naturaleza) realizara la curación. Como tratamientos recomendaba generalmente cambios de la dieta y unos pocos medicamentos y baños fríos y calientes. Su doctrina la plasmó en *De re medicina*, libro que se reeditó en 1478 en Florencia (Italia) y del que se hicieron otras muchas ediciones, lo que pone de manifiesto lo poco que avanzó la medicina en 14 siglos.

Otro famoso médico fue Claudio Galeno, tanto que su apellido se ha incorporado al lenguaje corriente como sinónimo de médico. Nació en Pérgamo (Anatolia) en el año 129 y se cree que murió en Roma en el 200. Fue un personaje de gran cultura que tenía respuesta para todo. Se supone que escribió alrededor de 500 libros, muchos de los cuales se han perdido.

Aunque filosóficamente era un ecléctico, pensaba que la teoría filosófica y la práctica médica estaban muy unidas. Creía que el cuerpo era simplemente el vehículo del alma y pensaba que todas las cosas, incluidas las estructuras corporales, tienen su función determinada por Dios. Esta especie de doctrina teológica les resultó atractiva tanto a los seguidores de la fe cristiana, como a los de la islámica, que fueron las dos religiones dominantes, durante muchos siglos, después de la caída de Roma.

Practicó la disección con perros, cerdos y monos de Berbería, dado que estaba prohibido realizarla con cadáveres humanos: En Pérgamo, donde fue médico de los gladiadores, pudo mejorar sus conocimientos anatómicos y comprobar el efecto de los remedios cicatrizantes en las heridas. Junto a relevantes observaciones anatómicas cometió muchos y graves errores fisiológicos. Describió las válvulas del corazón, se dio cuenta de las distintas estructuras de venas y arterias y llevó a cabo ciertos experimentos *in vivo*; por ejemplo, atando el nervio laríngeo recurrente demostró que el cerebro controlaba la voz y ligando los uréteres observó el funcionamiento de los riñones y de la vejiga urinaria. También comprobó que las arterias llevaban sangre y no aire como hasta entonces se creía.

Siguiendo a Hipócrates, derivó todo lo referente a la salud de los cuatro humores que relacionó con las complexiones sanguínea, flemática, colérica y melancólica; construyó su medicina a base de conjeturas y sus conocimientos fisiológicos fueron meras especulaciones. Sostenía que con cada inspiración se inhala el espíritu (*pneuma*) que procede del *espíritu universal general*. De los pulmones, siguiendo las venas pulmonares, llega al corazón en cuyo ventrículo izquierdo se encuentra con la sangre que se forma en el hígado (a partir del quilo elaborado con los materiales de la digestión de los alimentos); el quilo llega al hígado por la vena porta y una vez allí adquiere el *espíritu natural* pasando al ventrículo derecho y de aquí a los pulmones por donde se exhala. Sin embargo, parte de esta

mezcla procedente del hígado, atravesando la pared ventricular pasa al ventrículo izquierdo, donde mezclándose con el pneuma forma el *espíritu vital*. A la sangre que llega al cerebro por los nervios, a los que cree huesos, se le une el *espíritu animal* o alma.

Como puede apreciarse se trata de un conjunto de desatinos que son el resultado de montar grandes teorías e hipótesis sobre hechos pobre y escasamente observados. Sin embargo, entre sus muchos errores, estos médicos a veces adivinaron o acertaron ciertos aspectos nutritivos básicos que después se ha comprobado experimentalmente que eran ciertos. Por ejemplo, sabían que los alimentos que consumimos no se digieren y asimilan por completo, sino que dejan unos residuos que deben eliminarse, como heces y orina.

Los médicos griegos y romanos, como después harían los del Medioevo y Renacimiento, creían que una alimentación saludable necesitaba del equilibrio entre los alimentos ingeridos, que producían repleción y los ejercicios responsables de la evacuación, pero todo ello en un ambiente adecuado, tanto en sus aires como en sus situaciones.

1.2 La contribución de los médicos árabes

Durante la dominación musulmana el árabe fue el vehículo cultural más importante de Asia Menor, Grecia, Sicilia, Norte de África y Península Ibérica. De aquí que se tradujeran a esta lengua las grandes obras greco-romanas, que los intelectuales árabes conocían desde que la herejía de los cristianos nestorianos obligó a muchos de ellos a refugiarse en Persia y Bagdad que se convirtieron en dos focos culturales de primera magnitud, al que se uniría más tarde Córdoba. Los árabes mantuvieron y mejoraron la medicina greco-romana, pero, según Rhodes (1985), fueron incapaces de comprobar con rigurosidad sus ideas e innovaciones al carecer de una tecnología adecuada. En la mayor parte de los casos los escritores árabes fueron, como los monjes cristianos, meros depositarios y traductores de la cultura y medicina clásicas que practicaban y que supieron conservar y transmitir a las generaciones futuras.

Sin embargo, en Al-Andalus ya disponían en plena Edad Media de traducciones al árabe de la *Materia medica* de Dioscórides, tanto del griego como del latín. La primera de la que se tiene noticia es la que Constantino VII Porfirogeneta regaló a Abderramán III, fundador de la famosa Escuela de Medicina de Córdoba. En la España cristiana hubo que esperar a la versión que hizo la Escuela de Traductores a Toledo. Los árabes de Al-Andalus destacaron por sus conocimientos agrarios y por sus técnicas de irrigación y cultivos, lo que, como dice Losana Méndez (1994), les permitió mejorar la producción de alimentos. Fueron los introductores de la caña de azúcar y otros cultivos tropicales en la comarca de Motril. Otra faceta en la que destacaron fue en la higiene alimentaria. En el siglo XII Ibn Abdūn y Al-Saquiti publicaron sendos tratados de inspección de mercados en los que se contempla cuanto atañe a la limpieza e higiene de los alimentos, de los mercados (zocos) y de las calles adyacentes. En ambos textos se describen las funciones del *almotacén* o *mostasaf*, verdadero inspector y juez del mercado, con jurisdicción en cuanto concierne a los alimentos. También debe citarse el *Tratado sobre alimentos* de Al-Arbulí, nacido en la actual Arboleas (Almería) en las postrimerías del Reino Nazarí de Granada. Se trata de un pequeño libro de Bromatología, traducido por Díez García (2000) donde se revisa lo que entonces se conocía sobre propiedades e higiene de los alimentos.

Los médicos de la España musulmana fueron los primeros en usar, como medidas curativas y sobre todo profilácticas, la higiene y la dietética. Los más importantes fueron: Rhazhés o Abú Bar Mohamed Ibn Zacarina Ar-Razi (860-939) el médico musulmán más famoso del mundo árabe, además de prestigioso alquimista y filósofo. Nacido en Ray (Persia) cursó y ejerció la medicina en esta ciudad, pasando después a Bagdad. Es considerado el Hipócrates islámico. Escribió el *Kitab al Mansuri*, libro de práctica médica que se tradujo al latín en el siglo XII y ejerció una gran influencia en la medicina occidental.

Avicena (980-1037), llamado con razón el “Príncipe de los médicos”, ha sido el mejor conocido y más famoso de los médicos árabes. Escribió el *Canon de la medicina* que se basa en los escritos de los médicos griegos de la Roma imperial. Se trata de una verdadera enciclopedia de la ciencia médica, muy apreciada tanto en los países orientales como occi-

dentales. Fue un autor muy prolífico en todas las ramas del saber de su época ya que es autor de más de 200 tratados.

Albucasis (936-1013) destacó como cirujano en Córdoba que, en su época, era una populosa ciudad con una prestigiosa escuela de medicina, una magnífica biblioteca y numerosos hospitales en los que se practicaba una medicina avanzada.

Averroes (1126-1198) supo aunar el pensamiento árabe con el griego, destacó no solo como médico sino especialmente como filósofo, siendo un gran comentarista de Aristóteles y Platón. En sus escritos médicos se aprecia la influencia de Hipócrates y de Rhazhés.

Maimónides (1135-1204) nació en Córdoba en el seno de una familia judía de la clase alta. No solo fue un gran médico, sino un conocido jurista y filósofo excelso. Por motivos religiosos y raciales se vio obligado a dejar su ciudad natal, viviendo en Fez, Palestina y Egipto. Llegó a ser médico del sultán Saladino.

1.3 La Escuela de Salerno

Fue, sin ningún género de dudas, el centro cultural más importante de la Edad Media y el que más contribuyó, con los árabes de Al-Andalus y algunos monasterios cristianos, a la supervivencia de los conocimientos médicos greco-romanos. Fundada en los primeros 500 años del cristianismo (se desconoce la fecha exacta) alcanzó su máximo reconocimiento a mediados del siglo XII. Su obra más famosa fue el *Régimen Sanitatis Salernitanum* del que se hicieron muchas copias y traducciones. Como era costumbre entonces muchas de ellas sufrieron una serie de correcciones, eliminaciones y adendos lo que ha dado lugar a que los ejemplares ahora disponibles varíen mucho entre sí en extensión y contenido. Mientras algunas copias solo contienen 300 líneas de versos en latín, otras superan las 1.000.

Uno de los profesores más famosos de la Escuela de Salerno en el siglo XIII fue el médico valenciano Arnau de Villanova, que prestó sus servicios a los reyes Pedro III y Jaime II de Aragón y a los papas Bonifacio VIII, Benedicto XI y Clemente V. Como era frecuente entonces, ade-

más de médico fue astrólogo, alquimista y diplomático en ocasiones. Su libro más famoso fue el *Régimen Sanitatis*, publicado en 1307 y del que se hicieron muchas ediciones hasta bien entrado el siglo XVI.

La Escuela de Salerno, que en muchos aspectos fue por delante de su tiempo, desapareció sin dejar ni rastro. Sorprende que enseñase medicina a las mujeres, algo impensable en las escuelas médicas de su tiempo y todavía más, que les estuviese permitido formar parte del Consejo rector. Entonces, como en la antigüedad clásica, no se permitían las disecciones humanas, sino que generalmente se practicaban en los cerdos. De aquí que, como dice Rhodes (1985), el primer texto anatómico haya sido la *Anatomía porci*, escrita por Kopho que fue profesor de esta escuela.

En resumen, durante el Medioevo la praxis médica consistía fundamentalmente en observar los síntomas del paciente, examinar sus excreciones y emitir un pronóstico y tratamiento, que consistía siempre en un cambio del régimen de vida que incluía una serie de consejos concernientes a la dieta, al sueño, reposo, ejercicio, baños fríos o calientes, o ambos, y remedios o medicinas que eran mezclas de las llamadas *simples*, formadas por hierbas, raíces, hojas, flores y frutas, además de purgas y sangrías de las que a menudo se abusaba.

2. Ideas sobre nutrición y alimentos

Se ha dicho anteriormente que tanto la medicina árabe de Al-Andalus, como el *Régimen Sanitatis* de Salerno se regían por las enseñanzas de los grandes maestros de Grecia y Roma clásicas. Como ellos, los renacentistas creían que los alimentos modificaban los humores, de cuyas mezclas y equilibrios dependía el mejor o peor funcionamiento del organismo. Estaban convencidos de que las constelaciones astrales influían en el fisiologismo del cuerpo humano. De aquí que el *Régimen Sanitatis Salernitanum* dedique un capítulo entero a estos aspectos y que la mayoría de los colegas de Servet y él mismo creyesen en la astrología. Pensaban que los alimentos una vez digeridos no solo se modificaban y convertían en la propia sustancia corporal (lo que está de acuerdo con los conocimientos nutritivos actuales), sino que, además aumentaban el calor natural y daban vigor al cuerpo, debido a que incrementaban la sangre que es la vida del

animal, tal y como sostiene Aristóteles en *De anima*. Según sus propiedades o cualidades dividían los alimentos en calientes, fríos, húmedos, secos y templados; también los diferenciaban por su grado o intensidad de actividad y por último, atendiendo a su sustancia (lo que ahora llamaríamos valor nutritivo), los clasificaban en *grossi* o pesados (que son los que se queman lentamente y nutren mucho, como legumbres, cecinas, jamón, pescado seco y embutidos) y *subtiles* o ligeros (que se queman deprisa, como caldos, huevos, pollo y ternera). Siguiendo a Cruz (1997), diremos que Haly Abbas, en su *Pantegni* distingue tres grupos en vez de dos: los pesados que nutren mucho, incluso ingeridos en pequeñas proporciones, los sutiles que, por el contrario nutren poco aún consumidos en gran cantidad y los moderados o mediocres, cuyo poder nutritivo depende de la cantidad que se tome de los mismos. También distinguían tres tipos de dieta, de acuerdo con el autor anónimo de un *Regimen Sanitatis Salernitanum*: pesadísima, ligerísima y moderada. La ligerísima se recomendaba a las personas gruesas que no hacían trabajos pesados cuyo calor innato (el de los órganos corporales que no cambia con las estaciones meteorológicas, aunque disminuye con la edad) era escaso y su digestión era lenta. La pesada era la apropiada para quienes tenían un calor innato intenso y trabajaban o se movían mucho; finalmente los individuos templados o medios debían seguir una dieta moderada o media.

Sobre la bebida tenían ideas muy extrañas. Según la medicina renacentista, perseguía tres funciones: una *permixtiva* que ayuda a mezclar los alimentos para convertirlos en materia digestible, por lo que podía tomarse a la vez que los alimentos y lo mismo al principio que en medio o al final de la comida; otra *delativa* que tenía que tomarse después de terminada la primera digestión para facilitar el paso del quilo desde el estómago al hígado (segunda digestión) en donde se convertiría en la propia sustancia corporal y finalmente otra *sedativa*, para restaurar la humedad del organismo que se pierde durante el ejercicio y las digestiones y que se tomará al final de la comida, cuando la necesidad de agua es grande debido al ardor de los alimentos cálidos y secos.

2.1 Principales alimentos del Renacimiento

Muchos médicos renacentistas desconfiaron de la fruta simplemente por seguir las enseñanzas de Galeno, quien había escrito que originaba fiebre y que su padre llegó a centenario por haberse abstenido siempre de ella. Llegó a afirmar que los higos secos daban origen a los piojos. Ideas semejantes mantuvo el autor de *Governayle of Helthe* quien, según Drummond y Wilbraham (1958), recomienda abstenerse de este alimento. No obstante, la fruta podía emplearse con moderación, para reprimir la flema de quienes tienen cólera en abundancia, dicho de otra forma, determinadas frutas podrían emplearse en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un exceso de calor y sequedad, como las fiebres. A las mujeres lactantes se les advertía que si comían mucha fruta, sus hijos podrían morir víctimas de un flujo angustioso. Es muy probable que tal flujo se tratase de una de las muchas diarreas infantiles del verano que entonces causaban, como ahora en muchos países subdesarrollados, verdaderos estragos entre los lactantes.

Ni durante la Edad Media, ni durante el Renacimiento se dispuso de un buen método alternativo de la lactancia materna y aunque se hicieron muchos intentos de sustituir la leche de mujer por la de cabra, vaca o asna, la mayor parte fracasaron por falta de higiene. La única alternativa posible era contar con una buena ama de cría. A este respecto, eran muchos los que creían que cuando el niño fuera adulto tendría unas características morales que dependerían de la leche ingerida en su lactancia; si el ama era borracha, estúpida o de mal carácter, el lactante también lo sería después, en época adulta, y si el niño tomaba leche que contuviera sangre, con toda certeza sería asesino al alcanzar su madurez. De aquí que una vez aprobadas las cualidades morales del ama se examinase con suma atención y cuidado su leche. Según el *Régimen* de Salerno no debía ser “ni espesa, ni gruesa, ni demasiado acuosa y delgada”. Tenía que carecer de cualquier tonalidad oscura, azulada, rojiza o amarilla; según Phayre (1550), todas ellas son antinaturales y demoníacas.

Cuentan Drummond y Wilbraham (1958) que Jacques Guillemeau, cirujano de Enrique II de Francia, aconsejaba que las amas de cría se alimentasen con hervidos recientes de hortalizas que careciesen de yerbas y

de sabores fuertes que podrían impartir a la leche gustos o aromas extraños; debían elaborarse a base de lechugas, acederas, perejil, borraja, chupamieles y achicorias y por supuesto las amas “deberían abstenerse de todo tipo de frutas frescas”.

A partir del destete los niños se alimentaban de forma muy parecida a la actual, si bien no se les permitía tomar fruta. Su alimentación básica era el pan integral con leche. Se admitía que su complexión o temperamento era caliente y húmedo “como la semilla con la que se procrearon”, por lo que la frialdad y humedad de la leche debía mezclarse con las calidades del pan que engendraban cólera y melancolía. En otras palabras, trataban de disponer de una dieta equilibrada, lo que indudablemente conseguían gracias a que, como hoy sabemos, la mezcla de pan integral y leche entera resulta prácticamente equilibrada en todos los nutrientes. Cuando a los lactantes les aparecían los dientes de leche se les daban huesos de “muslo” de gallina con restos de carne para que los mordisquearan y a partir de los 15 meses, carne de pollo o de perdiz en pequeñas cantidades.

Al aumentar la edad, los niños recibían “carnes más gordas” y poco a poco iban adaptándose a la dieta los adultos pero, eso sí, teniendo en cuenta la complexión o carácter de su humor. Para disfrutar de larga vida se recomendaban aires buenos, una dieta con cantidades moderadas de carne de fácil digestión, queso, carne tierna de mamíferos y aves y buen pan de trigo. Había que abstenerse de yerbas crudas, verdolagas, lechugas y acederas jóvenes, salvo que se hubieran conservado en vinagre.

La leche se pensaba que era muy parecida a la sangre y se admitía que la última se convertía en leche en la mama. Por tanto, tenían una idea bastante real de la lactogénesis. Sabían que constaba de tres componentes: crema o nata, suero y cuajada, que se corresponden con los tres componentes mayoritarios de más interés a saber: grasa, extracto seco magro soluble y proteínas. Sostenían que la leche más nutritiva era la de mujer, seguida de la asna y cabra; la peor sería la de vaca. Todas estas ideas proceden del pensamiento greco-romano. Conocían de forma empírica una serie de propiedades de este alimento; por ejemplo, que era más nutritiva en verano, cuando las vacas disponían de praderas con abundante yerba, que en invierno. Algunos escritores renacentistas, más bien pocos, advierten que en determinadas circunstancias la leche puede alterar la salud, tal

era el caso, debido a su falta de higiene, de la mayoría de la vendida en las grandes ciudades. El suero de quesería lo consideraban una “bebida templada” que era a la vez “húmedo y nutritivo”. También lo tenían como alimento muy digestible, lo que está de acuerdo con la moderna nutrición. Puesto que tanto la leche como el suero se consideraban alimentos húmedos y fríos, convenían a las personas de complexión melancólica o colérica.

El queso se consumía fresco o recién elaborado, o bien después de madurado. Dada la tecnología alimentaria disponible solo podía conservarse el madurado. Sabían que el fresco era de más fácil digestión. Gozaron de merecida fama el Manchego y el de Tronchón (Teruel); ambos se elaboraban, como actualmente, con leche de oveja. Las excelencias nutritivas del de Tronchón las canta Sancho Panza en la obra maestra de Cervantes.

La mantequilla se consumía poco en España y nunca como grasa culinaria, dado que siempre se han preferido el aceite de oliva y la manteca. En cambio en Europa Central y del Norte, ha sido la grasa culinaria por excelencia. En España se utilizó muchos años como laxante con excelentes resultados lo que posiblemente se debía a que, al no disponer de métodos de conservación eficaces, se enranciaba rápidamente; hoy se sabe que bastantes de los productos originados durante el enranciamiento autooxidativo de las grasas ejercen un efecto irritante intestinal y manifiestamente laxante.

El pan de trigo, del que había menos variedades en la Edad Media que en la época romana, según hacen notar Drummond y Wilbraham (1958), siempre fue considerado un alimento muy digestivo y de gran valor nutritivo, pero era el más caro y el menos abundante, por lo que solo podían adquirirlo las clases altas. El pueblo bajo debía conformarse con el elaborado a base de centeno, sorgo, cebada, bellotas y habas (Sanz 1988). Este pan decían que provocaba “humores pegajosos” en el estómago, no obstante se utilizó para el tratamiento de la gota. Su efecto curativo en esta enfermedad posiblemente se debía, como sostenía Cogan (1584), a que al someter durante varios días o semanas a los gotosos a una dieta propia de las clases desfavorecidas mejoraba su estado debido a que esta afección “raras veces la padecían los pobres”.

La carne se consumía mucho entre los grandes señores y burguesía alta, en cambio la clase baja solo lo hacía de tarde en tarde y a veces en cantidades meramente testimoniales. Pensaban que ciertas “carnes indigestas, originaban humores infernales”; entre ellas no figuraba la de cerdo porque Galeno siempre la defendió; de todos modos Andrew Boorde se atrevió a criticarla suavemente: “... mientras Galeno y otros doctores antiguos y prestigiosos recomiendan la carne de cerdo, yo no osaré decir nada en contra pero estoy seguro de que nunca me gustó y en la Sagrada Escritura no se recomienda”.

3. La tecnología de los alimentos en el siglo XVI

Como se deduce de lo expuesto hasta ahora, en el Medioevo y primera mitad del siglo XVI se disponía de los mismos alimentos que en la época romana sin que apenas hubiera avanzado su tecnología. Únicamente en los monasterios se mantenían los conocimientos tecnológicos clásicos sin innovaciones dignas de citarse. Disponían de huertos que cuidaban y cultivaban con esmero, obteniendo buenos rendimientos de frutas y hortalizas. Contaban siempre con una pequeña parcela donde producían plantas medicinales, tenían colmenas con cuya miel atendían a sus necesidades edulcorantes diarias y también a la preparación de ciertos remedios terapéuticos, a base de yerbas silvestres y de las que cultivaban en el huerto, así como a la elaboración de diversas jaleas de frutas y de ciertas especialidades dulces de las que algunas han llegado a nuestros días. Había monasterios que tenían albercas en las que se practicaba una piscicultura rudimentaria, pero suficiente para satisfacer las necesidades de pescado de la comunidad.

El famoso médico británico, Andrew Boorde (1542), debió conocer bien el funcionamiento de estos huertos, ya que fue durante bastantes años cartujo, orden que por entonces se alimentaba casi exclusivamente con una dieta vegetariana. Se desconoce si fue por esto o por las rígidas normas de vida que imponía su orden por lo que la abandonó. Abandonó también Inglaterra y estudió en diversas universidades europeas, peregrinando a Compostela. Estando en Montpellier escribió su *Compendyous Regyment, or a Dietary of Health* (1542) que es uno de los primeros li-

bros ingleses que estudian la dieta. Una gran parte de la obra la dedica a las yerbas medicinales prestando escasa atención a las hortalizas de las que solo considera importantes a nabos, cebollas, ajos y berros.

En el Renacimiento habían aprendido de los romanos que la carne del ganado vacuno adulto, pero no viejo, era de sabor más intenso, saciaba más y se prestaba mejor a su transformación industrial que la de los animales jóvenes y excesivamente viejos. Preferían la carne de los animales castrados a la de los enteros y también sabían que la carne de los animales de caza era más dura, seca y magra que la de sus congéneres domésticos. Sabían asimismo que la carne de mamíferos resultaba más blanda, grasa y sabrosa en verano, cuando abundaban los pastos, mientras que la de aves alcanzaba su máxima categoría a principios de otoño.

Dada la escasez de pienso disponible para que el ganado sobreviviese hasta la próxima primavera, la llegada de los primeros fríos obligaba a sacrificar a todos los animales cuya vejez o debilidad hacía suponer que no resistirían hasta entrada dicha estación. En ocasiones las epizootias diezaban durante mucho tiempo la cabaña ganadera. En estos casos los campesinos eran los primeros en sufrir las consecuencias ya que sus señores les confiscaban con frecuencia ganados y cosechas viéndose obligados a sobrevivir de la recolección de vegetales silvestres comestibles, de la caza y de la pesca. Afortunadamente los palomares, que albergaban centenares de pichones, proporcionaban una fuente de carne fresca durante el invierno, pero una vez más eran los señores quienes disponían de la producción a su voluntad y es que siempre fueron los campesinos quienes más directamente padecieron las iras y caprichos de los poderosos, algo que Servet denuncia en uno de los escolios de la *Claudi Ptolomaei Alexandrini Geographicae Errationis Libri Octo* (véase Vives Coll, 1998), en el que dice "... los campesinos... vivían en una situación lamentable que los ha llevado a la derrota porque siempre pierden los pobres"

Seguían cultivándose habas, garbanzos, lentejas, guisantes y altramuces que, eran corrientemente la única fuente protéica al alcance de las clases bajas de las ciudades y de los campesinos pobres. Con las legumbres citadas, solas o mezcladas con cereales y con harina de bellotas y castañas, se elaborada un pan de alto valor nutritivo pero pesado, de aspecto poco agradable y de pésima calidad.

Las verduras disponibles eran las mismas que consumían los romanos, principalmente lechugas, achicoria, cardo, col, rábanos, acelgas, berros y otras. A ellas se sumaron las espinacas, originarias de Persia y del Cáucaso, que llegaron a la Península Ibérica hacia los años 1100-1200. Aunque ya se tenían noticias del maíz, las patatas, los tomates y otros muchos alimentos originarios del Nuevo Mundo, por las cartas de Hernán Cortés al Emperador y por las crónicas de las Indias del padre Acosta, Cieza de León y otros, su cultivo solo alcanzaría cotas importantes en España a finales del siglo XVII y siguientes.

Las frutas abundaban mucho y si bien, como hemos visto, los romanos y sus sucesores del Medioevo no eran muy partidarios de las mismas, dado que, en países como el nuestro eran baratas, se introdujo pronto la costumbre de comercializarlas, tanto frescas como desecadas al sol y al aire; entre las últimas destacan sobre todo, uvas, ciruelas, higos y melocotones.

3.1 Sistemas de conservación de alimentos

Los sistemas de conservación de alimentos que se habían empleado desde tiempos prehistóricos y que habían alcanzado un gran desarrollo con los romanos siguieron utilizándose durante todo el siglo XVI. Citemos, entre ellos, los siguientes:

- **Desecación.** Es un procedimiento de conservación de alimentos que se basa en reducir el agua de los mismos hasta límites incompatibles con el desarrollo microbiano. Se empleó tanto sola para el secado de vegetales (uvas, higos, dátiles, ciruelas y melocotones principalmente), como acompañada de la sal y lo mismo para conservar el pescado marino que el de agua dulce (bacalao, congrio, anguilas, barbos y otros) y la carne (cecinas y jamones de tipo serrano).
- **Ahumado.** Su efecto conservador radica en los componentes antisépticos que posee el humo, en el efecto desecante del calor y en la sal que se adiciona. Se practicó mucho en el norte de Europa y bastante menos en el sur, donde la abundancia de

días soleados y secos hizo que se prefiriese la desecación simple. Se aplicó, tanto a nivel particular como industrial, a las carnes y pescados.

- Sazonado con sal sólida o en salmuera. Fue una práctica muy corriente aplicada al pescado y a la carne, bien sola o acompañada de desecación, del ahumado o el vinagre.
- Escabechado y adobado. El escabechado, a base de vinagre y sal y el adobado que, además de vinagre y sal, lleva especias, yerbas aromáticas y algún licor, se utilizaron mucho en la conservación de todo tipo de alimentos (hortalizas, pescado troceado o entero de pequeño tamaño, carne de caza, etc).
- Fabricación de queso. Tenía lugar en el medio rural, predominando el elaborado con leche de oveja y de cabra, salvo en la cornisa del Cantábrico en donde se utilizaba la leche de vaca. La tecnología de fabricación, típicamente artesanal, consistía, como actualmente, en la coagulación de la leche con cuajo de corderos o cabritos lactantes o con “cuajo vegetal” (cardos y hierba Sanjuanera o cuajaleches), cortado y salado de la cuajada, separación del suero y prensado manual
- Elaboración de embutidos, cecinas y jamones. Eran prácticas habituales lo mismo en el medio rural que en las ciudades, en donde con frecuencia se sacrificaban los animales en plena calle, frente a la puerta de sus propietarios. Sanz Egaña (1949), ha estudiado la historia y desarrollo de la industria chacinera.

Por último señalaremos que, en muchos lugares, para conservar embutidos, otros productos del cerdo y quesos madurados se colocaban en orzas y recipientes análogos recubiertos de aceite de oliva. Así mantenían mucho tiempo sus buenas características de comestibilidad. La mayoría de los sistemas de conservación citados siguen empleándose en la actualidad.

4. Formación científica de Servet.

4.1 Primeros estudios

Miguel Servet Conesa nació el 29 de septiembre, festividad de San Miguel, de 1511 en Villanueva de Sijena (Huesca). Vino al mundo, por lo tanto, en pleno Renacimiento y como hombre culto de su tiempo adquiriría una sólida formación clásica y humanística. Nació en una familia de infanzones aragoneses perteneciente a lo que hoy llamaríamos clase media alta. Su padre, Antonio Servet, alias Revés (apelativo que también usó nuestro protagonista) estaba casado con Catalina Conesa y era notario de la villa, de Sijena y de su zona de influencia. Tuvo dos hijos más, Pedro, que fue notario como su padre, y Juan, que siguió la carrera eclesiástica. Miguel hizo sus primeros estudios en el monasterio de Montearagón de Quicena (Huesca), en donde se familiarizaría con el latín; más tarde aprendería también griego y hebreo. Además de español, hablaba correctamente alemán, francés, italiano y catalán.

Como paje de fray Juan de Quintana, franciscano que llegó a ser confesor del emperador Carlos I, Miguel recorrió gran parte de España. En 1528, es decir, a los 17 años siguiendo la tradición familiar y el consejo de su padre fue a estudiar Derecho a la Universidad de Toulouse, donde contactó con jóvenes de distintas procedencias e ideologías, tanto católicas como protestantes y en donde tuvo acceso a una bibliografía teológica muy variada, incluidos los *Loci Communes* del luterano Melancton, a cuya lectura dedicó todo su tiempo disponible, despreocupándose por completo de los estudios de Leyes.

En 1530 vive en Basilea en donde conoce a Ecolampadio, Bucero, Capito y otros teólogos con quienes polemizó verbal y epistolarmente en más de una ocasión. Ecolampadio le amenazó con denunciarlo como blasfemo por lo que Servet se ve obligado a escapar a Estrasburgo. Finalmente en 1531 publica en Haguenau (Alsacia) *De Trinitatis erroribus*, al que seguirían otras obras sobre Geografía, Astrología, Religión y Medicina. Únicamente estudiaremos las que se relacionan con la medicina y la bromatología. A las personas interesadas en la bibliografía servetiana les recomiendo la lectura de la monografía de Alcalá (1972), la de Vives Coll

(1997) y las publicaciones de Castro y Calvo (1932), Solsona (1988) y Barón (1970), de donde proceden muchos de los datos que aquí se exponen.

4.2 Médico renacentista

Firmando como Michaelae Villanovana, Miguel Servet publica en Lyon en 1536, esto es, antes de cursar medicina en París su apología contra Leonardo Fucium (*In Leonardum Fucium Apología defensio apologetica pro Symphoriano Campegio*). Se trata de una defensa de su maestro y amigo Symphorien Champier, médico de gran prestigio, fundador del Colegio de Medicina de Lyon que vivió en el último cuarto del siglo XV y primer tercio del XVI. Muy posiblemente la amistad de Servet con Champier se inició en la editorial de los hermanos Treschsel, donde aquél trabajó como corrector de pruebas y en la que se daban cita numerosos eruditos e intelectuales lioneses.

Como muchos de los médicos de su época Leonhard Fuchs o Fucium (1501-1566), fue un gran conocedor de la Botánica. Bávaro de nacimiento recibió una educación profundamente católica y humanista; no obstante, se convertiría después al protestantismo. Su libro *Historia Stirpium Commentarii*, publicado en 1542, antes del ataque de Servet, ocupaba un lugar destacado en el desarrollo de la Historia Natural, no solo por sus excelentes descripciones de las distintas especies florales que incluye y por la elegancia y fidelidad de sus dibujos, sino también por el glosario que las acompaña. Aunque como profesor de la Facultad de Medicina de Tubinga estaba interesado principalmente en las propiedades medicinales de las plantas, su Botánica es una excelente guía para la preparación de herbarios y la recolección de plantas. Buen conocedor del griego y del latín, fue un gran observador de la naturaleza. Como reconocimiento a sus contribuciones botánicas se creó el género *Fucsia* que comprende unas 100 especies de arbustos y árboles que crecen principalmente en América Central y del Sur y en Nueva Zelanda.

Symphorien Champier era también un médico con grandes conocimientos humanísticos pero, como científico, no puede compararse con Fuchs. Sin embargo, Servet que era por entonces, además de amigo, es-

cribiente y amanuense de Champier, lo defiende, como un apasionado discípulo, apoyándose en múltiples citas bíblicas; de otra parte, aprovechándose de la inquina que se apoderó de muchos por el abandono del catolicismo de Fuchs, lo critica muy duramente afirmando “no sólo que había calumniado a casi todos los médicos, sino que también habían denigrado a la Santa Iglesia Católica”. Al tratar de la escamonea sostiene que el bávaro está equivocado para lo que se apoya en los escritos de Dioscórides, Hipócrates y Galeno; de paso contrapone la medicina greco-romana a la árabe, olvidándose que ésta es más racional y completa y sobre todo mejor conocedora de los purgantes de aquélla.

Posiblemente si hubiera dispuesto de la traducción italiana de Dioscórides, que hizo en 1534 el conocido y respetado médico Pietro Mattioli (*Di Pedacio Dioscoride Anazarbeo libri cinque*), se habría evitado en parte esta polémica. En dicha traducción Mattioli indica que no está de acuerdo con Fuchs en que *Asclepias* de Dioscórides corresponda a *Cynanchum vincetoxicum*. Es curioso, por otra parte, que Galeno en su libro VI solo dedique una línea a esta planta, de la que escribe “... de esta yerba trata Dioscórides en el libro III pero todavía no tenemos experiencia sobre ella”. Font Quer (1973), de quien hemos tomado la cita anterior, concluye: “A lo cual podemos añadir que seguimos igual dieciocho siglos después”. Pienso que quizá Fuchs, al tratar de la *Asclepias* de Dioscórides se refería a *Cynanchum acutum* y no a *C. vincetoxicum*. La primera, que corresponde a la escamonea de Montpellier, es purgante, propiedad de la carece la segunda.

Servet también defendió las ideas de Champier sobre el “mal gálico” (sífilis) que diferían bastante de las de Fuchs, aunque ambos coincidieran en que era una enfermedad nueva que, según los teólogos de la época, se debía a la cólera divina. De haberse aceptado las tesis de Pietro Mattioli en su libro *De morbi gallici curandi, dialogus* (año 1530), habrían podido evitarse las posturas antagónicas de Fuchs y Champier y en consecuencia los duros ataques que Servet dedica al alemán. A pesar de esto y por paradójico que parezca, el gran humanista aragonés negaría su paternidad de la Apología contra Fuchs (más tarde volveremos sobre ello) .

La segunda obra de medicina que escribe Servet es el *Syruporum universa ratio ad Galeni censuram diligenter expolita* (Razón universal de

los jarabes presentada cuidadosamente según el parecer de Galeno). La primera edición apareció en París en 1537. Servet que acababa de matricularse en la Facultad de Medicina de París, estaba dotado de una gran inteligencia y era un excelente políglota, lo que le permitió conocer todas las ramas del saber de su tiempo, poseer un gran bagaje científico y una envidiable erudición. A ello debe añadirse que tuvo la suerte de contar con grandes maestros y condiscípulos. Como otros de sus coetáneos compaginó los estudios de medicina con los de geografía, meteorología, astronomía, matemáticas e incluso astrología, materias todas ellas que había cultivado antes de dedicarse a la medicina y que nunca abandonaría.

Todo lo anterior, unido a un firme carácter, le produjo más de un disgusto y le llevó a participar en duras y agrias polémicas y en ocasiones a realizar comentarios hirientes, gravemente ofensivos, como los que hizo a propósito de la astrología y la medicina según cuenta Gómez Rabal (1995) en la introducción al *Syruporum*: Afirmó que la astrología tiene una importancia decisiva en la medicina y "... que los médicos que no creían en ella eran unos ignorantes". Por ello se sintió ofendida la Facultad de Medicina de París y le acusó de astrología judiciaria.

4.3 Maestros y condiscípulos

Servet tuvo la suerte de contar con grandes maestros y condiscípulos entre los que destacaban Jacobus Sylvius, Gunther de Andernach, Ambroise Paré y Vesalio. Como buen aragonés, era apasionado pero no fanático, fue un fiel seguidor de las teorías hipocráticas y defensor, por lo tanto, de la *vis medicatrix naturalis*, esto es, de la fuerza restauradora de la homeostasis corporal que mantiene la salud. Desde sus primeras incursiones por la medicina se muestra galenista convencido, lo que no obsta para cuando lo cree conveniente critique a Galeno. A quienes censuró frecuentemente fue a los médicos árabes, contrariamente al parecer de muchos médicos de su época y especialmente de los seguidores de la Escuela de Salerno.

Jacobus Dubois, conocido como Sylvius (1478-1555), pero que nada tiene que ver con el descubridor del surco cerebral del mismo nombre, fue un gran admirador y defensor de Hipócrates y Galeno cuyas teorías se-

guía. Fue profesor de Anatomía de la Universidad de París, en donde enseñaba disección animal. Sus clases, que las dictaba en latín, estaban muy concurridas y fue igualmente un gran matemático.

Mantuvo frecuentes y duras polémicas con Vesalio a causa de Galeno, cuyos libros de Anatomía consideraba imprescindibles para la formación médica. Vesalio, que practicó la disección con cadáveres animales y humanos, se dio cuenta de que la anatomía de Galeno no se basaba en la disección del cuerpo humano, algo que estaba totalmente prohibido en el Imperio romano, sino en la aplicación al hombre de las conclusiones derivadas de la disección de animales, principalmente perros, cerdos y monos. Servet, sin embargo, sintió siempre un gran respeto y admiración por Silvio, como se refleja en las palabras que le dedica en el *Syroporum* "... aquel incomparable preceptor de la medicina más sana, Jacobo Silvio, varón destacado de agudo ingenio y clarísima interpretación de Galeno" (Discurso quinto. Sobre la composición de los jarabes).

Gunter von Andernach o Gunterius Andernachus, colaborador de Silvio y como él profesor de la Facultad de Medicina de París contó entre sus discípulos y ayudantes a Vesalio y a Servet.

En el prólogo de la 3ª edición de sus *Institutiones anatomicae* (1539) hace grandes elogios de Servet a quien sitúa científicamente a la misma altura que a Vesalio.

Ambroise Paré fue uno de los grandes cirujanos del Renacimiento. Como aprendiz de barbero-cirujano en 1533 estudió Anatomía y Cirugía en el hospital Hotel de Dieu y muy pronto destacó en ambas ciencias. Fue cirujano del ejército francés y desde 1552 cirujano real. En el ejército acostumbraban a cauterizar las heridas de bala con aceite hirviendo, pero en una ocasión en la que no se dispuso de este "cauterizante", lo sustituyó por una mezcla de yema de huevo, aceite de rosas y trementina, observando que las heridas así tratadas cicatrizaban antes y mejor que las que lo habían sido con aceite hirviendo. Sus resultados los recogió en *La méthode de traiter les playes faites par les arquebuses et autres bastons á feu* (Método para tratar las heridas debidas a los arcabuces y otras armas de fuego), obra que fue muy criticada por estar escrita en francés y no en latín.

Otra innovación de Paré, acogida inicialmente con cierto recelo, fue la ligadura de las grandes arterias, en vez de su cauterización con planchas de hierro al rojo vivo, para evitar hemorragias en la amputación de miembros. Fue también el primero en operar hernias inguinales sin castrar al mismo tiempo al paciente. Asimismo realizó por primera vez implantes dentarios y fue un obstetra destacado. Contrariamente a muchos cirujanos de su tiempo solo hacía uso de la cirugía cuando era absolutamente necesaria.

Andries van Wesel o Andreas Vesalius (1514-1564) fue un médico flamenco que revolucionó el estudio de la Biología y la práctica de la medicina por la meticulosidad con que describía la anatomía humana y animal. De 1529 a 1533 estudió humanidades en la Universidad de Lovaina, de donde pasó a la de París hasta 1536. Allí aprendió disección animal, bajo la dirección de dos famosos anatomistas: Jacobus Sylvius y Quintorius Andernachus. Tuvo igualmente la oportunidad de practicar la disección con cadáveres humanos. Al declararse la guerra entre Francia y España. Vesalio volvió a su patria y después marchó a Padua (Italia) en cuya universidad alcanzó el título de doctor en medicina y en donde fue nombrado profesor ayudante de cirugía, con la obligación de enseñar prácticas de disección.

En 1540, encontrándose en Bolonia y convencido de los fallos de la anatomía galénica, decide escribir un texto de anatomía humana profusamente ilustrado y basado en las múltiples disecciones que había realizado. Lo tituló *De humani corporis fabrica libri septem* (Los siete libros de la estructura del cuerpo humano) pero se llamó corrientemente *Fábrica*; se imprimió en Basilea en 1543. la *Fabrica* es la descripción más detallada y extensa del cuerpo humano escrita hasta entonces; introduce una nueva terminología anatómica y tanto los grabados como la organización de la obra alcanzan una perfección nunca lograda hasta entonces.

A principios de 1543 Vesalio presentó su libro al emperador Carlos quien lo nombró médico de la corte. Contaba entonces 28 años. Después de muerto el emperador, que le había asignado una pensión vitalicia y el título de conde, siguió al servicio de su hijo Felipe II y trasladó su residencia a Madrid. Murió en la isla de Zakinto (Grecia) en 1564 al regreso de una peregrinación a los Santos lugares.

4.4 Obras médicas

Pero volvamos a nuestro fascinante y universal aragonés. De 1541 a 1553 permanece en Viena del Delfinado ejerciendo la medicina al amparo del arzobispo Pierre Paulmier con quien le une una buena amistad desde su época parisina. Posiblemente fueron los mejores años de su vida: gozaba de gran prestigio profesional, de excelente salud y de una buena situación económica. Todo ello le permitió entregarse con tranquilidad y calma a los estudios bíblicos y a profundizar en sus ideas regeneracionistas del cristianismo, pero sin olvidarse de la medicina, como lo prueba la traducción que hace, con abundantes anotaciones, de la *Materia Médica* de Dioscórides del griego al latín, obra descubierta en Sesma (Navarra) y estudiada por primera vez por González Echeverría (1997). Volveremos más tarde sobre este tema.

El último año de su estancia en Viena aparece su obra más famosa *De christianismi restitutio*; llama poderosamente la atención que su teoría de la circulación menor de la sangre la expusiese en un libro como éste, eminentemente teológico pero, como dice Vives Coll (1988), no debe olvidarse que Servet aplicaba los modelos teológicos a la ciencia y a la vida. La oxigenación de la sangre en los pulmones, antes de llegar al corazón y “fruto del movimiento vital sanguíneo” fue un importantísimo descubrimiento. Hoy se admite que fue Ibn an-Nafis en sus *Comentarios al Canon de Avicena* quien describió por primera vez, en 1245 la circulación menor de la sangre. Lo que se desconoce es si Servet tuvo acceso a los mismos cuando llegaron manuscritos a Venecia en 1521. Quien si se cree que se aprovechó de ellos fue Juan Velarde de Amusco al describir la circulación en su *Composición del cuerpo humano* publicado en 1556. No obstante, durante muchos años se atribuyó a Matteo Realdo Colombo, autor del libro *De re anatomica* (1559), maestro del español Valverde, médico papal y magnífico profesor de anatomía de la prestigiosa universidad de Padua. Hoy ya todo el mundo científico-médico atribuye la paternidad del descubrimiento al sabio aragonés y algunos van más allá, como cuando dice García Bragado (1977): “Universalmente admitida la idea de que Miguel Servet fue el precursor del descubrimiento de la circulación san-

guínea, en cuanto a la pequeña o pulmonar, no faltan quienes como Mariscal..., creen que su descubrimiento fue el de la circulación sanguínea total”. Y añade “Asimismo hay que hacer constar que no solo en la *Christianismi restitutio* insertó el descubrimiento, sino que en 1541 ya lo expone en el diálogo *De trinitate divina..*”.

5. El Syruporum o Libro de los jarabes

El *Syruporum universia ratio* lo escribió Servet, como se dice más atrás, en París en 1537, el mismo año en que se matriculó en la Facultad de Medicina; tenía entonces 25 años. Ocho años más tarde aparece otra edición en Venecia (1545), a la que le siguen las tres ediciones de Lyon de 1546, 1547 y 1548 y la 2ª de Venecia (1548).

En la obra se distinguen dos partes claramente distintas: La primera, dedicada a la *concoctio* o digestión y la segunda que trata de los jarabes y que sigue la doctrina galénica imperante en toda la Edad Media.

Llama poderosamente la atención que en las palabras iniciales a los lectores niegue su autoría de la Apología contra Leonardo Fuchs, escrita unos meses antes en defensa de su maestro y amigo Sinfiorano Champier, que era un galenista convencido y rechazaba la autoridad de los médicos árabes. Afirma Servet que él no es aquel a quien Champier pintó en la Apología contra Fuchs, con lo que parece que intenta cargar dicha autoría al propio Champier. ¿Por qué lo hace? Hasta la fecha nadie ha encontrado una explicación convincente.

Desde las primeras líneas Servet se muestra, además de ferviente admirador del saber hipocrático y galénico, decidido partidario de los jarabes; afirma: “Defenderé que los jarabes o brebajes dulces preparatorios son sumamente útiles, no solo por la ayuda que prestan a la concocción, sino por otros muchos usos”.

Creo llegado el momento de advertir que, a pesar de su título, *Syruporum* o De los jarabes, la mayor parte de la obra se refiere a la digestión o *concoctio*. Este concepto constituye el tema fundamental. Al éxito de la obra contribuyeron, sin duda alguna, tal y como afirma su traductora Gómez Rabal, los remedios o medicamentos que incluye y los detalles que

da de las formas de prepararlos y administrarlos. Servet defiende también, como la medicina clásica greco-romana, la *vis medicatrix*; en cambio quita valor a la uroscopia que tanto apreciaban los médicos árabes y que practicaban mucho la mayoría de los del Renacimiento.

Como era lógico en un tiempo en el que no se tenía ni la más remota idea de los factores que desencadenan la enfermedad y mucho menos de la Bacteriología, la etiología de cualquier proceso patológico la atribuían a la discrasia o alteración de las funciones corporales y de los humores internos.

El sabio aragonés afirma en varias ocasiones (discursos I y V), que entre los defensores de la salud están “los buenos jugos de los alimentos..” que los recomienda con preferencia a “... las hierbas secas”. Y añade: “.. en los jugos exprimidos... está íntegra la virtud de las yerbas, más que en la decocción de éstas y si hay alguna acuosidad en la hierba reciente, se quitará por medio de la decocción del jugo”. Desconoce las razones químicas de sus afirmaciones, pero los avances nutritivos han confirmado su validez, dado que los alimentos recién obtenidos, esto es, frescos, son los que muestran íntegros su valor nutritivo y sus componentes volátiles.

Como buen galénico, entre las defensas de la salud incluye, además de los alimentos, “... los fomentos, las cataplasmas, el masaje (sobre todo de los pies), el baño, el sueño, el descanso y el vino moderadamente cálido”. Defiende (discurso I) que hay una sola digestión (concoctio) y no dos, o incluso tres, que admitían algunos de sus coetáneos. Pero desgraciadamente sigue pensando y así lo hará en todo el *Syruporum* que, además de los alimentos también se “concoccionan” los humores enfermos”. Y señala que entre la concocción del pus y la enfermedad y la del alimento no hay diferencia alguna, salvo en el fin de una y otra, pues el de la digestión del alimento es la asimilación y el de la del pus y la enfermedad la corrupción.

No obstante y aunque se apoye en los escritos de Galeno, explica con bastante lógica el fundamento de la digestión. Señala en el discurso I: “En primer lugar la naturaleza *digiere*, en segundo lugar *separa*, en tercer lugar *expulsa*”. Y continúa: “Va primero, pues, la concocción que conduce a la perfección, para que lo que pueda ser asimilado se reduzca a alimento de la naturaleza. Después lo que no es de tal género es separado, como

excreción y es, finalmente expulsado, por que si permaneciera se haría dañino y no alimentaría a la naturaleza”.

Cuando uno piensa en lo escrito por Servet y comprende su capacidad de raciocinio no puede menos que lamentar que él, lo mismo que sus coetáneos, no practicase una medicina experimental en vez de argumentar una y otra vez a favor de los puntos defendidos y divulgados por Galeno y sus seguidores. Aunque desde el punto de vista estrictamente científico no puedan justificarse sus elucubraciones filosóficas y no experimentales, debe tenerse siempre presente que se hicieron en un momento en el que en muchos países estaba prohibida hasta la experimentación con cadáveres humanos.

El discurso III es una discusión de tipo aristotélico en la que nuestro protagonista, basándose de nuevo en las doctrinas de Galeno y en sus propias deducciones, argumenta una y otra vez a favor del efecto “incrasante” (espesante) de la concocción al que atribuye, entre otras cosas, la mayor o menor consistencia de las excreciones. Choca que, junto a ciertas aseveraciones que son verdaderos disparates, *v.gr.* que “... la condensación tiene lugar cuando al evaporarse las partes húmedas, las secas se amalgaman”, hay otras que son totalmente válidas en la actualidad, por ejemplo, “... cuando una sustancia de composición variada, después de haber mezclado bien sus partes componentes, es acercada al fuego para que hierva, cuando más se cuece, tanto más espesa se hace”. En el discurso IV se extiende en una serie de farragosas explicaciones y definiciones antes de referirse a las razones que aconsejan o prohíben la purga. Insiste en que debe aplicarse una vez acabada la concocción o digestión, dado que “... la naturaleza expele después de haber concocado y segregado”.

El discurso V, al que Servet titula “*sobre la composición de los jarabes y sus distintos usos*”, es el más interesante bromatológicamente hablando. Bajo la denominación de jarabes incluye jugos y extractos de frutas, decocciones edulcoradas con miel o azúcar y otras preparaciones similares. Dice que los antiguos jamás oyeron el nombre de jarabes, a pesar de utilizar bebidas aperitivas a base de vino y miel, bebidas dulces y otros preparados que ayudaban a purgar. Señala que las tres razones que justifican el empleo de los jarabes son.

1. Para ayudar a la concocción.
2. Para ayudar a las purgas.
3. Para favorecer las sangrías.

Por estas razones es partidario de los jarabes en general entre los que incluye a las decocciones que también extraen “algo del jugo de las hierbas”. Sin embargo prefiere los *verdaderos jugos* de las hierbas frescas a partir de los cuales pueden elaborarse pociones dulces. Es consciente de la peor calidad de los preparados a partir de plantas secas: “Además, que las hierbas secas, más agrias de lo debido, no las recomendaremos tanto como los jugos exprimidos, en los cuales está íntegra la virtud de las hierbas, más que en la decocción de éstas”. De este párrafo se deduce que aunque Servet no conocía la química de los cambios experimentados por los jarabes al envejecer, sí que había observado las pérdidas que se producen en los jugos obtenidos de los vegetales cuando se dejan estar bastante tiempo a la temperatura ambiente y a la acción directa del sol. Hoy se sabe que, además de las pérdidas de sabor y aroma, se produce también una disminución del valor nutritivo, principalmente de vitamina C y modificaciones del color. Se conocen muchas de las reacciones químicas responsables de dichas pérdidas y se sabe que en algunas están implicadas ciertas vitaminas con lo que se pierde gran parte de su actividad. Por otra parte, cualquier persona puede comprobar las diferencias gustativas que hay entre un zumo recién preparado y el que se toma después de 8-10 horas de permanencia a temperatura ambiente.

Servet era un buen conocedor de los jarabes árabes entre los que distinguía los siguientes: julepe, jarabe, apocema, robub y looc. Además sabía como prepararlos. Por ejemplo, indica que “el julepe se elabora con azúcar o con cualquier jarabe al que se le adicionan para aclararlo cuatro partes de agua”. Añade, sin embargo, que es más frecuente hacerlo con azúcar e infusión de flores.

Séame permitido señalar con ciertas licencias, la técnica general de elaboración del julepe seguida por nuestro protagonista. Para ello, dice, se vierten rosas o violetas en agua hirviendo procurando reducir al mínimo la evaporación. Después, una vez extraídas las flores, se clarifica la infusión y a continuación se le adiciona azúcar y se somete a ebullición con lo que queda hecho el julepe. Recomienda usarlo en estado fresco y no mu-

cho después; se deja preparado frío para tomarlo con el fin de refrescar, humedecer y apagar la sed. Aunque desconocía la existencia de los microorganismos y por supuesto, el efecto que en ellos ejerce la disminución del agua disponible (o actividad del agua) sí que sabía, de forma empírica, que para conservar mucho más tiempo el julepe, preparado como queda dicho, "... en lugar de una breve ebullición se le aplica una cocción perfecta con una medida mayor de azúcar, a manera de los jarabes". Así se conseguía concentrar el julepe, al perderse agua por evaporación, lo que sumado a la adición de azúcar daba por resultado una disminución de la a_w o agua disponible para el desarrollo microbiano, con lo que se inhibía por completo la actividad microbiológica y consecuentemente la alteración o deterioro del jarabe.

Y continúa Servet, "Por eso son más apreciados los julepes con dicha infusión que con las aguas que se obtienen al destilar las hierbas tostadas y quemadas, pues esta agua despiden no sé qué olor ígneo y no conservan las virtudes de las hierbas..." Una vez más hace gala de sus dotes observadoras ya que, efectivamente, como hoy se sabe, algunos de los productos del tostado y de la pirólisis de los vegetales, que se han sometido a temperaturas de tostado (muy altas), tienen, además de sabores amargos y aromas picantes, ciertos productos tóxicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos.

En expresión de Servet, "El apocema difiere del jarabe en que no se cuece tan perfectamente, ni se conserva tanto como él. Hay quienes lo llaman jarabe largo, sin embargo, de acuerdo con la verdad, no es más que una decocción a la cual, para darle sabor, se le añaden condimentos dulces o también sustancias medicamentosas". Tal y como está descrito, es lógico que su conservación sea breve ya que recibe un tratamiento térmico más corto que el del jarabe y no se incorpora más azúcar que el que llevan los "condimentos dulces". En estas condiciones la vida útil del apocema ha de ser muy limitada puesto que se trata de un buen substrato para la multiplicación de los microorganismos que, aunque entonces fuesen desconocidos, no por ello dejaban de estar presentes ni de ejercer su capacidad deteriorante.

Afirma igualmente el ilustre aragonés que "Los robub son jugos sin dulzor espesados al sol o al fuego". Serían por lo tanto, simples zumos

vegetales, extraídos por presión, a los que se les hace perder parte de su agua de constitución por evaporación, bajo la acción directa del sol o del calor (deseccación). Añade que “Los robub de este tipo no están en uso porque no deleitan al gusto, a no ser que se les mezcle algo de dulce, cosa que hacen ya muchos...” Como ejemplo cita el de nueces que utilizaba como medicamento su admirado Galeno.

El looc, dice que “... no se toma líquido, sino que reteniéndolo en la boca se chupa...” y añade. “Se usa con miel para descongestionar, en la tos y en otras afecciones del tórax”. Sería pues, una especie de dulce balsámico del estilo de los caramelos y gominolas utilizadas hoy en día para suavizar la garganta en los procesos catarrales.

Veamos ahora la tecnología general de elaboración de jarabes recomendada y seguida por Servet: “Se toman aproximadamente tantos manojos de hierba u onzas de raíces, de semillas o de flores, como libras de agua. Se deja cocer la mezcla hasta reducir su volumen a la mitad. Sin embargo, las raíces pueden cocerse más si fuera necesario; las flores menos, lo mismo que los jugos, primero se cuecen éstos solos”. Añade que en todos los casos el agua de cocción se cuele y clarifica con clara de huevo; después se mezcla con el mismo peso de miel o de azúcar. Puede añadirse más o menos, dependiendo del amargor del agua de cocción y del gusto del paciente. Se mezcla lo más homogéneamente posible mientras se calienta hasta alcanzar la viscosidad necesaria, momento en el que se considera elaborado el jarabe. Los apocemas serían una especie de jarabe de cocción muy breve.

Señala que prefiere los apocemas a los jarabes, debido a que los primeros se consumen recién hechos, mientras que la calidad de las hierbas utilizadas para elaborar los jarabes pierde mucho con el transcurso del tiempo o por una cocción excesiva. Esto concuerda con los conocimientos de la moderna bromatología, pero en el invierno al faltar las hierbas y no poder elaborarse apocemas, no queda más remedio que disponer de jarabes elaborados para todo el año. Lo mismo que su admirado Galeno, sabe preparar también medicamentos con miel y jugos de nueces, moras, granadas y membrillos. Se trataría, dice, de looc y de robub. Su conservación, sin embargo, requiere una decocción con miel, ya que en otro caso se alteraría pronto.

Servet, quien con tan buen juicio y conocimiento describe la tecnología de elaboración de los distintos jarabes y las condiciones en que deben conservarse para aumentar su periodo de vida útil, al tratar de sus aplicaciones, sigue, como la mayoría de sus coetáneos, las reglas de Hipócrates y Galeno que justifica, como siempre, mediante una serie de razonamientos filosófico-deductivos que nada tienen que ver con el método experimental. Son muy curiosas las razones que da para explicar con Galeno... “que en el nardo hay una fuerza concmotriz no exigua frente a todas las afecciones que enfrían”. Sin embargo, dice con gran sentido pocas líneas más abajo: “No obstante, el régimen alimenticio debe ser de fácil concocación, de buen jugo y de régimen húmedo”, frase que con el lenguaje actual diría: “una dieta blanda a base de alimentos de fácil digestión y jugosos”.

Son tan curiosas, confusas e incomprensibles las razones que aduce a favor del efecto terapéutico de los jarabes que no me resisto a copiarlas: “En los jarabes, al igual que en lo demás de un régimen alimenticio húmedo, nos proponemos (...) nutrir con un alimento húmedo, engendrar sangre más fría para que no se convierta en bilis, hacer frente al calor y a la sequedad que se manifiesta en las partes sólidas y rebustecer esas mismas partes sólidas. Y para estos fines el agua no es apta, ya que, verdaderamente no humedece ni las partes sólidas (...) pues el agua se altera rápidamente y en cambio los jarabes más espesos mantienen más tiempo sus propiedades y no se convierten en bilis con tanta facilidad”.

Como se ve no son simples especulaciones, como las utilizadas por cuantos seguían a Galeno. Frente a esto y refiriéndose al efecto laxante de los jarabes, señala que “... es importante el haber provocado la deyección siempre a la misma hora y el haber acostumbrado siempre a la naturaleza”. Y continúa: “En efecto, los alimentos pueden servir habitualmente de instrumentos para estimular las deyecciones”. Se trata de unas afirmaciones que ratificaría en este momento cualquier especialista en nutrición o en medicina digestiva. Una vez más el espíritu observador de Servet y el conocimiento de la mejor bibliografía médica de su tiempo le permiten hacer una praxis médica correcta. Y termina este apartado diciendo que: “... con el uso de laxantes los cuerpos se mal acostumbran”, algo que también enseña la Farmacología desde hace años.

En el discurso VI, con el que termina el *Syruporum* y al que Servet titula “Qué debe hacerse después de las purgas”, se refiere a las sustancias que se administraban a los pacientes después de que hubiesen actuado los purgantes. Conocidos como “lavativas o ablucientes”, consistían generalmente en una infusión ligera e insípida de cebada o de sus brotes, sin valor nutritivo (o como él escribió, que “... no sea tomada por la naturaleza como alimento”). De la lectura de este capítulo, con abundantes referencias a los clásicos griegos, parece deducirse que Servet se muestra poco entusiasta de los purgantes potentes cuyos efectos recomienda que no se prolonguen mucho, de aquí el empleo de los ablucientes una vez que ha actuado el purgante, ya “... que esto obligaría al fármaco a descender rápidamente y reprimiría su fuerza y sus extorsiones”.

6. Miguel Servet traductor de Dioscórides

Ya se ha dicho, al hablar de los maestros griegos, el gran prestigio y fama que tuvo entre los médicos de la Edad Media y hasta bien entrado el siglo XVIII la *Materia médica* de Dioscórides, libro del que se hicieron múltiples ediciones, primero en el griego original y después en latín, árabe y lenguas vulgares. Precisamente la dificultad que para muchos lectores interesados suponía el griego, obligó a su difusión al principio en latín y más tarde en lenguas vulgares. La primera edición en español fue la del médico segoviano Andrés Laguna.

Hasta que Francisco J. González Echeverría publicó en 1997 un pequeño y documentadísimo volumen en el que da cuenta del hallazgo en la parroquia de Sesma (Navarra) de un Dioscórides con anotaciones y escolios de Servet, se pensaba que las únicas traducciones debidas a escritores castellanos eran las de Antonio de Nebrija, Amato Lusitano, Juan Jaraba y el citado Andrés Laguna. Atendiéndonos a la obra de González Echeverría, cuya lectura recomendamos encarecidamente, el que no aparezca el nombre de Servet en esta versión del Dioscórides, posiblemente se debe al hecho de que Francia cuanta ya en el año de su publicación (1546) con el catálogo de Libros Prohibidos en el que se incluyen a Fuchs, citado por Servet, a él mismo y a una serie de personas, con las que mantuvo fre-

cuentes relaciones intelectuales, que formaban un grupo de autores in-nombrables y reprobados por la autoridad eclesiástica.

En las veinte anotaciones que Servet hace al Dioscórides y que González Echeverría incluye en su publicación se aprecian, además de los grandes conocimientos botánicos de Servet, su perfecto dominio del griego clásico. Mención especial merece la cuarta anotación que se refiere a la canela, en la que distingue entre lo que hoy se denomina *Cinnamomum verum* (sin *C. zeylanicum*) que es la más cara y *C. cassia*, la más barata y la que seguramente sería la utilizada en la Europa del siglo XVI. En la anotación sobre la berza marina (*Calystegia soldanella*) hace constar que su descripción está llena de errores en el original de Dioscórides y pone de manifiesto la diferencia que hay entre la longitud de sus hojas (según el texto) y la similitud real que presenta con las aristoloquias. La anotación a la endivia constituye una prueba más de sus conocimientos y preocupaciones nutritivas; dice, sin ningún rodeo, que no ve razón alguna por la que la planta cultivada haya de ser más provechosa al organismo que la silvestre, cuando ambas son de la misma variedad. Entonces todavía se desconocían la fisiología y química vegetales, sin embargo Servet, basándose solo en los conocimientos de su época y en su claro pensamiento lógico, afirma lo que bastantes años más tarde confirmarían Liebig y otros padres de la química agrícola.

Del Dioscórides de Servet se hicieron en total ocho ediciones, dos de ellas después de su muerte. Según González Echeverría, a quien tantas veces nos hemos referido, las notas marginales de las traducciones de la *Materia medica* hechas por Mattioli y Laguna, son iguales a las de Servet pero “adornadas como si fuesen sus propios comentarios” y en otras ocasiones expresadas hasta con las mismas palabras usadas por Servet.

Para terminar, haré más las siguientes palabras de González Echeverría: “En definitiva una de las mayores obras médicas vigentes hasta el siglo XVIII en las universidades, como es el Dioscórides, se añade a la bibliografía de Serveto”.

Muerte de Servet

Las agrias y abundantes polémicas que mantuvo nuestro sabio con los más famosos teólogos, médicos, filósofos y políticos, tanto católicos como reformadores o protestantes, le acarrearón muchos enemigos, enemistad que alcanzó su punto álgido con la publicación en Hagenau, en 1531, de su obra *DE TRINITATIS ERRORIBUS*, que fue seguida, en 1532, de los *DIALOGI DE TRINITATAE ET DE IUSTITIA REGNI CHRISTI*.

Fue buscado y perseguido por la Inquisición española, que nunca lo capturó, por la francesa que lo prendió pero de cuya prisión huyó y por Calvino, quien tras un proceso que duró dos meses, lleno de ignominia y de contradicciones con la doctrina que predicaba, consiguió que lo condenaran a muerte de hoguera.

Murió a mediodía del 27 de octubre de 1553, quemado vivo a fuego lento, de leña húmeda, en Champel, barrio o suburbio de Ginebra, donde una inscripción en piedra y semioculta así lo recuerda.

En la iglesia de Champel hay un retablo alegórico de la muerte de Servet en la hoguera.

7. Bibliografía

- (1) ALCALÁ, A. (1972). *Nuestra deuda con Servet*. Revista de Occidente. Págs. 233-260
- (2) BARÓN, J. (1970). *Miguel Servet. Su vida y obra*. Espasa Calpe. Madrid.
- (3) BOORDE, A. (1542). *A compendious Regyment, or a Dietary of Health*. Citado por Drummond y Wilbraham, 1958.
- (4) CASTRO Y CALVO, J.M. (1932). *Contribución al estudio de Miguel Servet y de su obra Syruporum*. La Académica. Zaragoza.
- (5) COGAN, T. (1584). *The Haven of Health*. Citado por Drummond y Wilbraham, 1958.
- (6) CRUZ CRUZ, J. (1997). *Dietética Medieval*. La Val de Onsera, Huesca.
- (7) DíEZ GARCÍA, A. (2000). *Un tratado nazarí sobre alimentos*. Arráez Editores, Almería.

- (8) DRUMMOND, J.C Y WILBRAHAM, A. (1958). *The Englishman's Food*. Jonathan Cape, Londres.
- (9) FONT QUER, P. (1973). *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. 2ª Ed. Editorial Labor, S.A. Barcelona.
- (10) FUSCH, L. (1542). *Historia Stirpium Comentariorum*. Officina Isingriana, Basilea.
- (11) GARCÍA BRAGADO, F. (1977). *Miguel Servet, Editor del Dioscórides*. Instituto de Estudios Sijenenses "Miguel Servet". Villanueva de Sijena (Huesca).
- (12) GONZÁLEZ ECHEVERRÍA, F.J. (1977). *Miguel Servet y su descubrimiento de la circulación pulmonar*. Instituto de Estudios Sijenenses "Miguel Servet". Villanueva de Sijena (Huesca).
- (13) LOSANA MÉNDEZ, J. (1994). *La sanidad en la época del descubrimiento de América*. Ediciones Cátedra. Madrid.
- (14) MATTIOLI, P.A. (1530). *De morbid gallici curandi dialogues*. Giovanni Farri. Venecia.
- (15) MATTIOLI, P.A. (1543). *Di pedaccio Dioscoride Anazarbeo libri cinque*. Vincenzo Valgrisi. Venecia.
- (16) PHAYRE, T. (1550). *The Regiment of life, with the booke of children, newly corrected and enlarged*. Citado por Drummond y Wilbraham, 1958.
- (17) RHODES, PH (1985). *An Outline History of Medicine*. Butterworth and C° Ltd. Londres.
- (18) SANZ EGAÑA, C. (1949). *La enciclopedia de la carne*. Espasa Calpe. Madrid.
- (19) SANZ PÉREZ, B. (1988). *El ayer, hoy y mañana de la Bromatología*. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia. Madrid
- (20) SERVET, M. (1195). *Syruporum Universia Ratio ad Galeni censuram diligenter expolita*. Traducción al español de Gómez Rabal, Ana. MRA, Creación y Realización Editorial, S.L. Barcelona.
- (21) SOLSONA MOTREL, F. (1988). *Miguel Servet*. Diputación General de Aragón. Departamento de Cultura y Educación. Zaragoza.
- (22) VIVES COLL, A. (1998). *Miguel Servet, humanista crítico*. Instituto de Estudios Sijenenses "Miguel Servet". Villanueva de Sijena (Huesca)

Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

_____ Artículo Original _____

Ceramida como mediador de la resistencia a insulina producida por el factor de necrosis tumoral alfa en adipocitos marrones*

ROSARIO HERNANDEZ, TERESA TERUEL Y MARGARITA LORENZO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040-Madrid.

RESUMEN

La resistencia a la acción de la insulina es la característica fundamental de la Diabetes tipo 2, que afecta al 6% de la población, siendo la Obesidad el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la misma. El nexo de unión entre ambas patologías puede ser el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, una citoquina antilipogénica secretada por el propio tejido adiposo. En estudios previos hemos demostrado que el TNF-alfa produce resistencia a la insulina en adipocitos marrones fetales en cultivo primario. TNF-alfa activa varias cascadas de señalización incluyendo la estimulación de esfingomielinasas y la producción de ceramidas tras 30 min de tratamiento. Hemos estudiado el efecto de un análogo de ceramida permeable, de cadena corta (C2-ceramida) añadido exógenamente, sobre los efectos metabólicos de la insulina y su señalización. Este compuesto completamente impide la estimulación del transporte de glucosa por insulina, impidiendo la translocación de GLUT4 a la membrana, tanto determinada por Western blot o por la localización inmunofluorescente de GLUT4. El pretratamiento de las células con C2-ceramida previno la fosforilación de Akt total y de las dos isoformas expresadas en los adipocitos marrones, Akt1 y Akt2, pero no inhibió la actividad PI3-quinasa total ni la activación de PKCzeta. La ceramida está activando una fosfatasa implicada en

* Premio "ex aequo" del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Año 2001

defosforilar Akt, como se desprende de las observaciones siguientes: 1) el tratamiento con ceramida o con TNF-alfa aumenta la actividad fosfatasa PP2A, 2) el tratamiento con ácido okadaico junto con ceramida restaura completamente la fosforilación de Akt por insulina y 3) la transfección transitoria de una forma constitutivamente activa de Akt no restablece la fosforilación de Akt. Estos resultados indican que la ceramida producida por el TNF-alfa induce un estado de resistencia a insulina en los adipocitos marrones, manteniendo Akt en un estado defosforilado e inactivo.

Palabras clave: Transporte de glucosa-TNF-ceramida-adipocito-Resistencia a Insulina

SUMMARY

Ceramide mediates Insulin resistance by Tumor Necrosis Factor alpha in brown adipocytes

Tumor necrosis factor (TNF) alpha caused insulin resistance on glucose uptake in fetal brown adipocytes. We have explored the hypothesis that some effects of TNF-alpha could be mediated by the generation of ceramide, since TNF-alpha treatment induced the production of ceramide in these primary cells. A short-chain ceramide analogue, C2-ceramide, completely precluded insulin-stimulated glucose uptake and insulin-induced GLUT4 translocation to plasma membrane, either determined by Western blot or by immunofluorescent localization of GLUT4. These effects were not produced in the presence of a biologically inactive ceramide analogue, C2-dihydroceramide. Analysis of the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase signaling pathway indicated that C2-ceramide was precluding insulin stimulation of Akt kinase activity, but neither PI3-kinase nor PKCzeta activities. C2-ceramide completely abolished insulin-stimulated Akt/PKB phosphorylation on both regulatory residues Thr308 and Ser473 as TNF-alpha did, as well as inhibited insulin-induced mobility shift in Akt1 and Akt2 separated in PAGE. Moreover, C2-ceramide seems to be activating a phosphatase involved in dephosphorylating Akt since 1) a PP2A activity was increased in C2-ceramide and TNF-alpha-treated cells, 2) treatment with okadaic acid concomitantly with C2-ceramide completely restored Akt phosphorylation by insulin and 3) transient transfection of a constitutively active form of Akt did not restore Akt activity. Our results indicate that ceramide produced by TNF-alpha induced insulin resistance in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state.

Key words: Glucose transport-TNF-ceramide-adipocyte-Insulin resistance

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica con múltiples defectos metabólicos, caracterizada por hiperglucemia resultante de una inadecuada actividad de la insulina. Se distinguen dos tipos fundamentales de diabetes: Diabetes tipo 1 o insulino-dependiente, desorden en el que existe un defecto en la producción de insulina debido a una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, y la Diabetes tipo 2 o insulino-independiente (NIDDM), con un componente de predisposición genética, pero en la que el estilo de vida, la edad y la Obesidad juegan un papel muy importante para el inicio y severidad de la enfermedad. La Diabetes tipo 2 comienza con una disminución en la sensibilidad de los tejidos periféricos (hígado, tejido adiposo, músculo) a la insulina circulante. El organismo responde con un aumento en la secreción basal y post-prandial de insulina por el páncreas dando como resultado una situación de hiperglucemia e hiperinsulinemia que termina por provocar fallo pancreático y pérdida de la secreción de insulina (Figura 1).

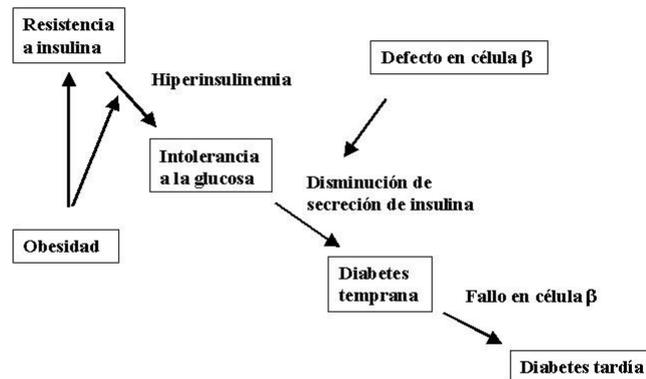


Figura 1.- Etapas en el desarrollo de la Diabetes tipo 2

La organización mundial de la salud (OMS) considera la Diabetes como una epidemia global. En 1995 el número de enfermos diagnosticados de Diabetes ascendía a 110 millones, siendo de tipo 2 en el 95% de los casos. La Diabetes Mellitus se asocia con un elevado riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y actualmente se considera la cuarta causa de muerte por enfermedad en los Estados Unidos. Por todo ello se están realizando grandes esfuerzos de investigación encaminados a prevenir la Diabetes tipo 2 y al desarrollo de nuevos fármacos que impidan la progresión de la misma. Para ello, es importante conocer las bases mole-

culares de esta patología. El primer defecto que ocurre es una resistencia generalizada a la acción de la insulina, impidiendo la captación de glucosa por los tejidos periféricos (músculo esquelético, y tejidos adiposos, tanto blanco como marrón), que en condiciones fisiológicas responden a dicha hormona por tener receptores para la misma y expresar el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 [1]. Tanto factores genéticos como adquiridos pueden influir en la sensibilidad a la insulina. En el primer caso la carencia de receptores de insulina (IR) produce resistencia a la insulina y muerte fulminante por cetosis inmediatamente tras el nacimiento, sin embargo el conjunto de casos de NIDDM por mutaciones en el IR representa entre un 1-5% del total de casos descritos en la literatura científica, por lo que no parece una causa esencial de resistencia a la insulina en pacientes diabéticos [2]. La Diabetes tipo 2 se considera una enfermedad poligénica, y los modelos animales con inactivación funcional de genes blanco de señalización generados por recombinación homóloga nos da idea de la complejidad de la enfermedad. Los ratones delecionados para el IR presentan un desarrollo intrauterino normal pero mueren rápidamente tras el nacimiento por cetosis [3]. La inactivación específica de IR en el músculo (ratón MIRKO) produce una resistencia moderada a la insulina, pero los animales no llegan a desarrollar diabetes, posiblemente porque los receptores de IGF-I sean capaces de compensar [4]. Por el contrario, la deleción específica del IR en el tejido adiposo marrón (BATIRKO) da un fenotipo diabético sin resistencia a insulina [5]. Sin embargo la inactivación funcional de ambos receptores para IGF-I e insulina en el músculo (ratón MKR) produce resistencia a insulina y diabetes, estando fuertemente afectado el transporte de glucosa tanto en músculo como en el tejido adiposo marrón [6]. Curiosamente, mientras que el animal delecionado para GLUT4 no sufría diabetes, sin embargo la ablación específica de GLUT4 en el músculo o en el tejido adiposo produce una severa intolerancia a la glucosa [7] [8]. Estos datos de modelos animales nos indican la importancia de identificar nuevos factores que estimulen el transporte de glucosa en células musculares y adiposas. La Obesidad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la diabetes tipo 2 [9]. Los obesos humanos presentan niveles de expresión disminuidos del receptor de insulina, y de IRS-1 en casos severos [10], así como presentan estas proteínas fosforiladas en Ser, lo que atenúa la fosforilación en Tyr

por la insulina. También se han descrito casos donde la actividad tirosina fosfatasa PTP1B estaba aumentada [11]. Esto hace pensar que además de factores genéticos, existen factores adquiridos que pueden contribuir a la resistencia a la acción de la insulina. Entre ellos destacan la hiperinsulinemia, la propia hiperglucemia [10] así como los metabolitos derivados de la ruta de las hexosaminas.

Los factores secretados por el tejido adiposo, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), leptina y la recientemente descrita resistina [12], o los ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis del mismo, son importantes candidatos para causar resistencia a la acción de la insulina [13]. Se ha propuesto al TNF-alfa como el nexo de unión entre adiposidad y desarrollo de resistencia a insulina ya que 1) la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos y tienen aumentada la expresión de TNF-alfa en sus adipocitos y 2) los animales obesos delecionados para la función del TNF-alfa no desarrollan resistencia a la insulina [14]. Se ha descrito que el TNF-alfa produce la fosforilación en Ser del IRS-1 prohibiendo su fosforilación en Tyr por la insulina [15]. Muy recientemente se ha generado un animal transgénico en el que la inactivación funcional de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) protege contra la resistencia a la insulina muscular inducida por obesidad [16]. Por otro lado los ácidos grasos son también importantes candidatos a mediar la resistencia a insulina en obesidad. Su acción puede ser a través de la formación de ceramidas, o bien induciendo la activación de una cascada de quinasas que implique a la IKKbeta [17]. En este sentido se ha descrito hace solo unos meses que en animales obesos dosis altas de salicilato, capaces de inhibir el factor nuclear NFkB y su activador IKKbeta, representan un tratamiento potencial para la diabetes [18]. Las tiazolidindionas (TZD) son fármacos sensibilizadores a la acción de la insulina que actúan a través de su unión al factor de transcripción PPARgamma, aunque el mecanismo por el que median la sensibilización a la acción de la insulina no está todavía definido [19]. Estudios “in vivo” demuestran que tratamientos crónicos con estos compuestos aumentan la expresión de PPAR gamma en el músculo [20] y mejoran los efectos metabólicos de la insulina en ratas obesas resistentes a la acción de la insulina [21].

Las rutas de señalización de la insulina que participan en el transporte de glucosa no están totalmente establecidas: la vía de la fosfatidil inositol (PI) 3-quinasa ha demostrado ser necesaria pero no suficiente y otras vías paralelas han sido recientemente propuestas. Los efectores por debajo de PI3-quinasa implicados en el transporte de glucosa son controvertidos. Existen datos a favor y en contra de Akt y de la isoforma atípica de la proteína quinasa C (PKC) zeta como mediadores de los efectos de la insulina sobre la translocación de GLUT4. Por otro lado tampoco se conoce con exactitud como dichas vías pueden estar alteradas durante la resistencia a la insulina, aunque acabamos de apuntar algunos de los pasos de señalización que se pueden ver comprometidos.

Los adipocitos marrones fetales en cultivo primario son un excelente sistema celular para el estudio de la implicación de las diferentes vías de señalización de la insulina en procesos como proliferación, diferenciación, supervivencia, y transporte de glucosa, puesto que presentan un elevado número de receptores de insulina y responden a ella a concentraciones fisiológicas [22]. Estudios previos de nuestro grupo de investigación habían establecido la implicación de la ruta de PI3-quinasa en la expresión génica de GLUT4 por insulina en cultivos primarios de adipocitos marrones [23]. Entre las dianas que se conocen por debajo de PI3-quinasa que podrían estar implicadas en el transporte de glucosa inducido por insulina, se encuentran la Ser/Thr quinasa Akt/PKB y la PKCzeta. En este sentido, PKCzeta se ha descrito recientemente como un eslabón importante en la ruta de la insulina que conduce al aumento en la captación de glucosa tanto en los adipocitos blancos [24] como en los marrones [25]. Sin embargo, la implicación de Akt en dicho proceso no había sido explorada. Datos de nuestro laboratorio indican que el TNF-alfa también produce resistencia a insulina en adipocitos marrones, ya que bloquea la acción de la insulina a nivel de IRS-2, por lo que pensamos explorar más en profundidad este mecanismo [26].

En este trabajo nos hemos planteado estudiar la implicación de Akt/PKB en la regulación por insulina del transporte de glucosa y de la expresión génica de GLUT4 en adipocitos marrones fetales de rata en cultivo primario. Un segundo aspecto que nos ha interesado investigar es el mecanismo de inducción de resistencia a la insulina por TNF-alfa sobre

el transporte de glucosa y sobre la expresión génica de GLUT4 en adipocitos marrones a través de la generación de ceramidas.

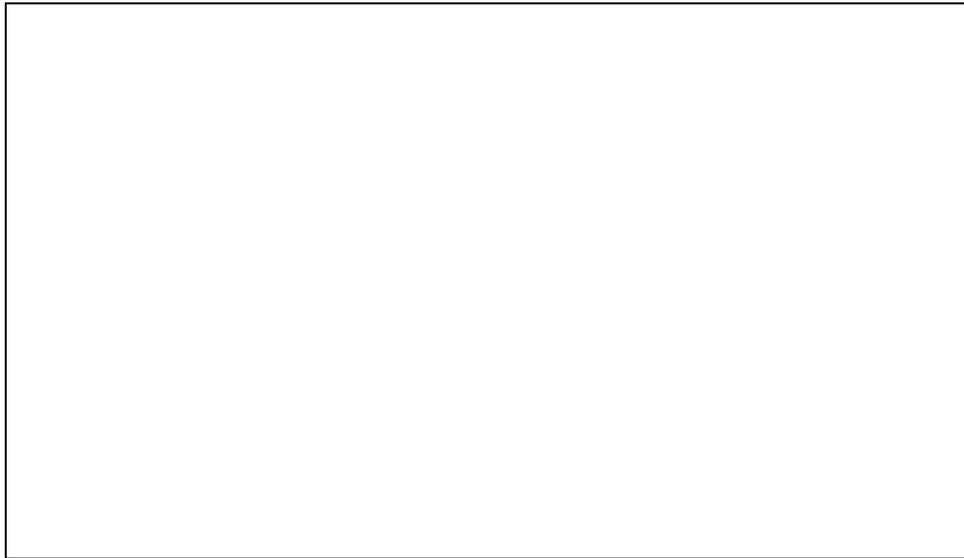
RESULTADOS Y DISCUSION

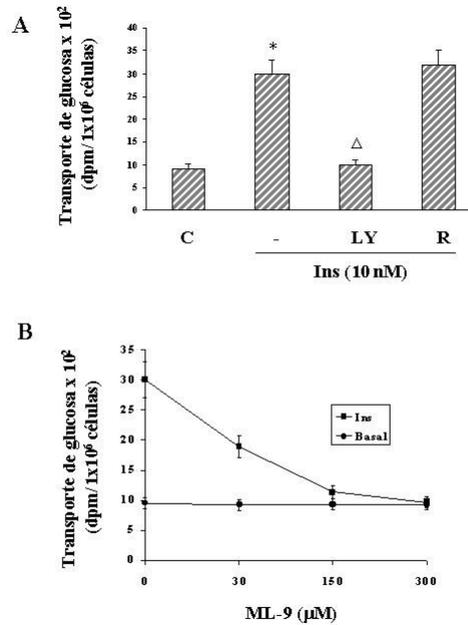
IMPORTANCIA DE AKT/PKB EN LA REGULACIÓN POR INSULINA DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUT4 EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO

Como el transporte de glucosa en adipocitos marrones fetales es estimulado por la insulina, quisimos estudiar en primer lugar si era inhibido en presencia de inhibidores químicos de la ruta de señalización de la insulina. Para ello, partimos de un cultivo primario de adipocitos marrones fetales cultivados en un medio con 10% de suero fetal durante 5 horas. A continuación se retiró el suero a las células y se mantuvieron durante 20 horas en un medio suplementado con 0.2% de BSA. Para la medida del transporte de glucosa las células control o pretratadas durante 30 minutos con LY294002 10 μ M o rapamicina 25 ng/ml en el medio KRP, se estimularon con insulina 10 nM durante 30 minutos. La incorporación de 2-deoxi-D-(1- H^3) glucosa se midió durante los últimos 10 minutos del cultivo. La figura 2A muestra que las células tratadas con insulina presentan un aumento en la incorporación de glucosa de tres veces respecto a las células control. Por otra parte el compuesto LY494002, que inhibe la actividad PI3-quinasa estimulada por insulina y consecuentemente la fosforilación de las dianas que están por debajo de ella, como Akt/PKB y p70S6 quinasa inhibe completamente los efectos de la insulina sobre el transporte de glucosa. La proteína p70S6 quinasa es fosforilada en respuesta a insulina, sin embargo bloqueando únicamente su fosforilación con la rapamicina no se observan cambios en la incorporación de glucosa inducida por insulina. Estos resultados indican que la insulina aumenta el transporte de glucosa en los adipocitos marrones a través de una vía de señalización que implica a la PI3-quinasa y a otras dianas situadas por debajo de ella diferentes de p70S6 quinasa.

Utilizando un compuesto químico (ML-9) recientemente propuesto como inhibidor de la actividad Akt, [27] pudimos comprobar que efectivamente en los adipocitos marrones en cultivo dicho compuesto

tivamente en los adipocitos marrones en cultivo dicho compuesto inhibía tanto la fosforilación de Akt en el residuo Ser 473 como su actividad en respuesta a insulina, sin afectar a la actividades PI3-quinasa ni PKC zeta [28]. El transporte de glucosa inducido por insulina, medido mediante la incorporación de 2-deoxi-D-(1-H³) glucosa a las células, se vio totalmente bloqueado en células pretratadas con dicho inhibidor (Fig. 2B).





La insulina estimula la incorporación de glucosa a las células principalmente por su capacidad de reclutar el transportador de glucosa GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la superficie celular. Por ello quisimos determinar si los efectos inhibitorios del ML-9 en el transporte de glucosa inducido por insulina eran debidos al bloqueo de la capacidad de la insulina para translocar el transportador GLUT4. Utilizamos dos aproximaciones distintas: 1.- medida de la cantidad de GLUT4 en las fracciones subcelulares de membrana interna y membrana plasmática por Western blot en adipocitos marrones pretratados con el inhibidor y posteriormente estimulados con insulina, y 2.- estudios de translocación por inmunofluorescencia en células HeLa cotransfectadas con el plásmido de expresión GFP-GLUT4 (GLUT4 unido a una proteína verde fluorescente, que permite visualizar su localización mediante microscopía de fluorescencia) y con la construcción dominante negativa de Akt [29] (Fig. 3). Los resultados de dichos experimentos confirmaron que la activación de

Akt es necesaria para el transporte de glucosa y la translocación de GLUT4 inducidos por insulina en los adipocitos marrones fetales.

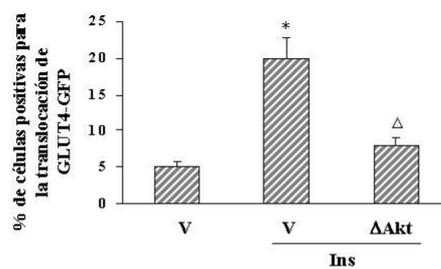


Figura 3.- Akt con actividad dominante negativa (Δ Akt) inhibe la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática inducida por insulina.

Las células HeLa se cotransfectaron transitoriamente con 10 μ g de GLUT4-GFP y 10 μ g de Δ Akt o 10 μ g del vector vacío (V). A continuación las células se cultivaron durante 24 horas en un medio de cultivo con 10% de suero fetal, se privaron de suero durante una noche y se incubaron en presencia o ausencia de insulina 500 nM (Ins) durante 30 minutos para visualizar la translocación de GLUT4-GFP por microscopía de fluorescencia. Las células se consideraron positivas para la translocación de GLUT4 si se observaba un anillo de fluorescencia en la periferia celular. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas (medias \pm SEM de 4 experimentos distintos). El estudio para calcular el grado de significación estadística se ha realizado como en la Fig. 2. Las diferencias entre los valores en presencia de insulina vs. controles se representan por (*) y las diferencias entre los valores en presencia de insulina más Δ Akt vs. insulina se representan por (Δ); *, Δ p<0.01.

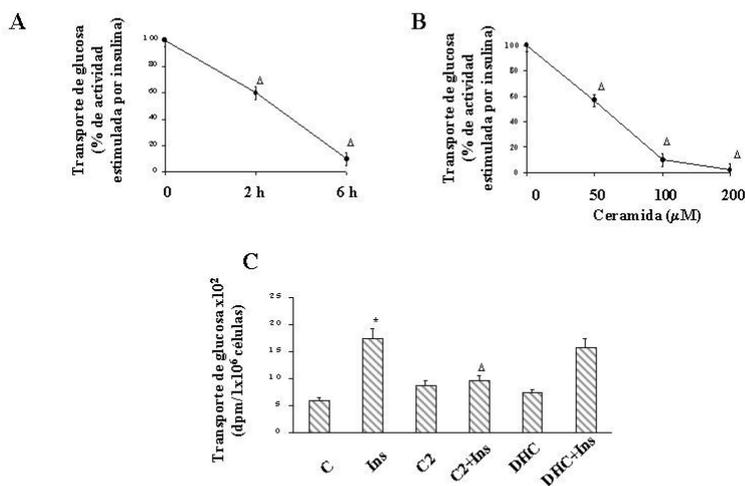
Además de los efectos agudos de la insulina sobre la translocación de GLUT4, el transporte de glucosa en los tejidos insulino-dependientes también puede estar regulado por cambios en la expresión génica de los transportadores de glucosa inducidos por tratamientos crónicos con insulina. En este sentido nuestro grupo de investigación había descrito previamente que la insulina aumenta la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones de manera dependiente de PI3-quinasa. Puesto que Akt está situada por debajo de PI3-quinasa, quisimos investigar la posible implicación de Akt en dicho efecto. Con ese propósito bloqueamos la actividad Akt mediante el empleo del inhibidor químico ML-9 y realizamos ensayos de Northern blot para medir la cantidad del mRNA de GLUT4 en respuesta a insulina. Asimismo, para determinar si los efectos eran a nivel de la transcripción del gen, cotransfectamos las células con la construcción GLUT4-CAT (donde el gen CAT está bajo el control del promotor de GLUT4), y con el plásmido de expresión para la proteína Akt con actividad dominante negativa. Los resultados obtenidos en dichos experimentos demostraron que, por debajo de PI3-quinasa, Akt participa en la vía de señalización implicada en los efectos crónicos de la insulina que conllevan a un aumento en la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones.

MECANISMO DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA POR TNFALFA EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUT4 EN ADIPOCITOS MARRONES A TRAVÉS DE LA GENERACIÓN DE CERAMIDAS.

Como se ha comentado anteriormente, la Resistencia a la acción de la insulina es la característica fundamental de la Diabetes tipo 2, y dicho defecto se ha relacionado estrechamente con la Obesidad. El nexo de unión entre ambas patologías puede ser el TNF-alfa, una citoquina antilipogénica secretada por el propio tejido adiposo. Se ha demostrado previamente que la expresión del TNF-alfa en tejido adiposo está elevada en una variedad de modelos experimentales de obesidad y en personas

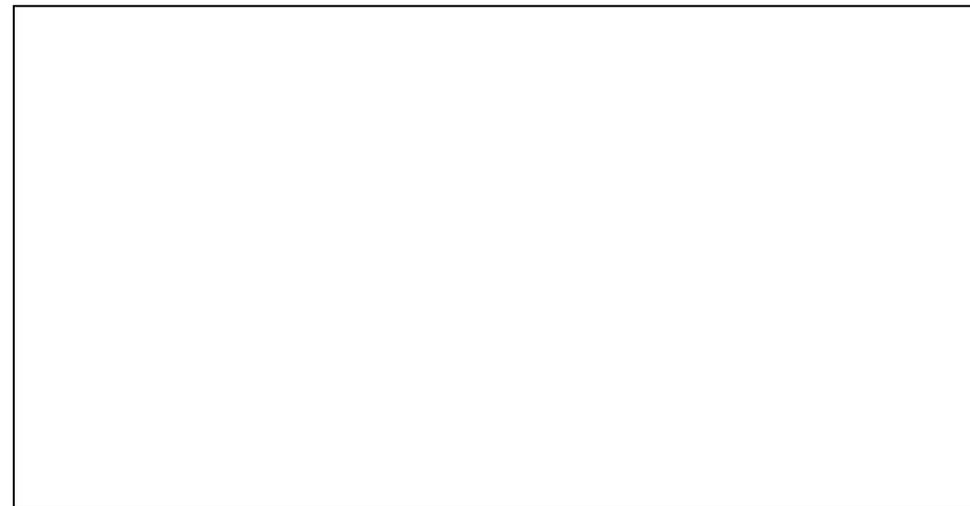
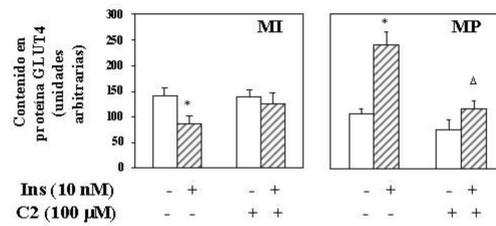
obesas. Ratones deficientes en TNF-alfa (TNF- $\alpha^{-/-}$) donde se les indujo la obesidad de modo genético o a través de una dieta rica en grasa, no presentaban resistencia a la acción de la insulina viendo mejorada la sensibilidad a la misma. Además estos ratones presentaban niveles bajos de ácidos grasos libres circulantes pudiendo resultar esto de la pérdida de los efectos lipolíticos del TNF-alfa en el tejido adiposo, o alternativamente podría reflejar el aumento de la eficiencia de la insulina para suprimir la lipólisis en ausencia de TNF-alfa [14]. Estos resultados indican que el TNF-alfa es un importante mediador de la resistencia a la acción de la insulina en la obesidad. El TNF-alfa actúa por unión a receptores de membrana, activando varias cascadas de señalización, entre ellas la activación de esfingomielinasas que hidrolizan la esfingomielina para dar lugar a ceramidas, que podrían ser el mediador celular de los efectos biológicos del TNF-alfa. Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el TNF-alfa produce resistencia a la insulina en adipocitos marrones fetales en cultivo primario, disminuyendo el transporte de glucosa inducido por insulina y la expresión génica de GLUT4 estimulada por insulina [26]. Nosotros nos propusimos estudiar si las ceramidas mediaban la inhibición del TNF-alfa sobre los efectos agudos y crónicos ejercidos por la insulina en los adipocitos marrones fetales. En primer lugar, comprobamos si en este sistema celular, el TNF-alfa inducía la producción de ceramidas. Para ello, las células fueron tratadas con TNF-alfa (0,6 nM) a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 min, 6 y 24 horas) y la cantidad intracelular de ceramidas se midió mediante tratamiento de la fracción lipídica con el enzima diacilglicerol quinasa, capaz de fosforilar tanto el diacilglicerol (dando lugar a ácido fosfatídico), como las ceramidas (generando ceramida-1-fosfato). El TNF-alfa produjo un pico máximo de ceramidas a los 30 min volviendo a niveles basales al cabo de 1h, para volver a incrementarse a las 6 horas y permanecer elevados tras 24 horas de tratamiento. El primer pico de generación de ceramida puede ser debido a la activación por TNF-alfa de una esfingomielinasa como se ha propuesto por varios autores, mientras que el aumento de los niveles de ceramida a tiempos más largos de tratamiento con TNF-alfa (6 y 24 horas) podría ser el resultado de la síntesis *de novo* a partir de ácidos grasos como consecuencia del efecto lipolítico del TNF-alfa en el tejido adiposo.

Puesto que en respuesta a TNF-alfa, se produce un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas, se planteó la hipótesis de que dichas ceramidas podrían mediar algunos efectos del TNF-alfa en los adipocitos marrones. Estudiamos en primer lugar los efectos de las ceramidas añadidas exógenamente a distintos tiempos y diferentes dosis sobre el transporte de glucosa. Debido a la naturaleza hidrofóbica de las ceramidas naturales, éstas son muy insolubles, por lo que empleamos un análogo de ceramida permeable de cadena corta, denominado C2-ceramida, así como un análogo biológicamente inactivo (C2-dihidroceramida) como control negativo. El transporte de glucosa inducido por insulina se vio inhibido tras pretratamiento de las células con C2-ceramida de forma dependiente del tiempo y de la dosis, siendo 6 horas de pretratamiento y la dosis de 100 μ M las condiciones de máxima inhibición (100%) y por tanto las utilizadas en todos los experimentos posteriores (Fig. 4). Por el contrario la C2-dihidroceramida no afectó el transporte de glucosa.





Los resultados obtenidos con ceramida en el transporte de glucosa fueron corroborados con experimentos de translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por técnicas de inmunofluorescencia y de fraccionamiento celular, en los que se comprobó que la inducción de la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática por insulina no se producía en células pretratadas con C2-ceramida (Fig. 5).



Como la ceramida afectaba al transporte de glucosa y a la translocación de GLUT4 estimulados por insulina, quisimos estudiar a conti-

nuación a que nivel de la ruta de señalización por la que la insulina ejerce dichos efectos estaba actuando la ceramida. Por ello determinamos en primer lugar la actividad de la PI3-quinasa tras estimulación con insulina en células pretratadas con ceramida. La ceramida no modificó la estimulación por insulina de PI3-quinasa, tanto la asociada a IRS-1 como a IRS-2 indicando que la ceramida no interfiere con la insulina a este nivel. Por debajo de PI3-quinasa, la siguiente diana estudiada fue Akt. Akt/PKB se fosforila fuertemente en el residuo Ser473 y algo menos en Thr308 tras estimulación con insulina. Ambas fosforilaciones son necesarias para la activación de dicha enzima. Sin embargo, tras el pretratamiento de las células con C2-ceramida la insulina no fue capaz de fosforilar ni activar Akt, mientras que el análogo inactivo C2-dihidroceramida no produjo ningún efecto negativo. Puesto que los adipocitos marrones expresan la proteína PKCzeta que también ha sido relacionada con el transporte de glucosa estimulado por insulina, analizamos si las ceramidas estaban afectando su actividad enzimática. Sin embargo, C2-ceramida no sólo no inhibió la activación de PKCzeta por insulina sino que la estimuló *per se*, siendo el efecto aditivo en presencia de los dos tratamientos. Ya se había descrito anteriormente que la ceramida por sí sola estimulaba la actividad PKCzeta [30]. Por ello estos resultados excluyen a la PKCzeta como diana de la ceramida para producir resistencia a la acción de la insulina.

El tratamiento con ceramida inhibió la actividad Akt/PKB, pero no la actividad PI3-quinasa ni PKCzeta, por lo que decidimos investigar los mecanismos de esa inhibición. Nos planteamos dos posibles mecanismos para explicar los efectos de la ceramida: La ceramida podría estar inhibiendo la actividad PDK1 y PDK2 necesarias para la fosforilación y posterior activación de Akt/PKB y/o, podría estar activando una fosfatasa que defosforilase Akt/PKB y por lo tanto estuviese inhibida la actividad de Akt/PKB. El primer posible mecanismo fue descartado tras analizar la actividad de Akt/PKB en células transfectadas con un plásmido de expresión para una forma permanentemente activa de Akt/PKB (pSG5-PKB_{gag}, GagAkt) y comprobar que la actividad Akt/PKB presente en las células control transfectadas estaba inhibida tras el tratamiento con ceramida. La segunda hipótesis fue estudiada impidiendo la defosforilación de Akt/PKB con un inhibidor de serina/treonina fosfatasas, el ácido okadaic

co. El pretratamiento conjunto de ácido okadaico más C2-ceramida restauró completamente la fosforilación por insulina de Akt/PKB en los dos residuos de Ser473 y Thr308 que se ve inhibida completamente en las células pretratadas con C2-ceramida sólo. Estos resultados muestran que la ceramida es capaz de inhibir también la forma constitutivamente activa de Akt/PKB; mientras que la defosforilación de Akt/PKB por ceramida se revierte al tratar las células con un inhibidor de proteínas fosfatasas (ácido okadaico) [31]. En este sentido podríamos concluir que la ceramida inhibe la ruta de señalización de la insulina responsable de la translocación de GLUT4, manteniendo a Akt/PKB en un estado inactivo y defosforilado (Fig. 6).

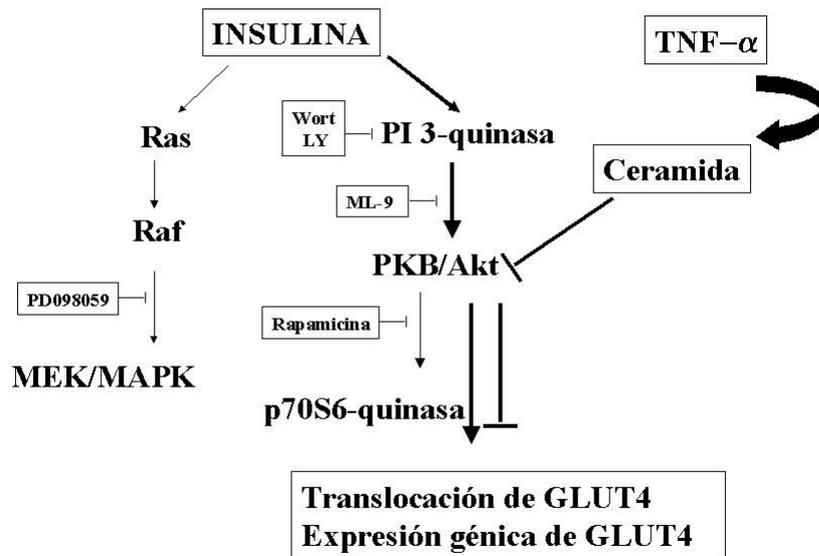


Figura 6. – Rutas de señalización implicadas en el transporte de glucosa insulina dependiente: Resistencia a la insulina por TNF-alfa

En líneas celulares adipogénicas como 3T3-L1, el TNF-alfa inhibe el proceso de diferenciación adipogénica, previniendo la expresión de genes específicos de adipocitos, entre ellos el gen de GLUT4. Quisimos estudiar el efecto del TNF-alfa y su mediador, la ceramida, en la señalización de la insulina que conduce a la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones fetales. Realizando ensayos de Northern blot comprobamos que el tratamiento con TNF-alfa o C2-ceramida por sí solos no modificaba la expresión basal de mRNA de GLUT4 pero disminuía completamente la acumulación de GLUT4 inducida por insulina. Estos resultados indicaban que tanto TNF-alfa como C2-ceramida estaban interfiriendo en la regulación transcripcional de este gen por insulina. En consecuencia decidimos estudiar el efecto de ambos compuestos en la transactivación del promotor de GLUT4 mediante el empleo de la construcción GLUT4-CAT. El tratamiento con insulina de células transfectadas produjo un incremento de seis veces en la actividad CAT. Sin embargo, la transactivación del promotor de GLUT4 estimulada por insulina no se produjo en presencia de TNF-alfa o C2-ceramida. Los factores de transcripción específicos involucrados en la transactivación por insulina del promotor de GLUT4 no han sido todavía identificados, pero se ha descrito la existencia de elementos de respuesta a los factores de transcripción de la familia de los C/EBPs en el promotor del gen de GLUT4. Además se ha comprobado que el TNF- α reduce los niveles de C/EBP α en líneas celulares adipocíticas 3T3-L1 [32], por lo que decidimos estudiar el efecto del TNF-alfa/ceramida en la acumulación del mRNA de C/EBP α por Northern blot. El tratamiento con insulina durante 24 horas produjo una inducción en los niveles de expresión de C/EBP α , siendo este efecto totalmente inhibido por el tratamiento con TNF-alfa o C2-ceramida. Estos resultados coinciden con la disminución del mRNA de GLUT4 tras la estimulación con los mismos factores y sugieren la posible existencia de un mecanismo indirecto por el cual la ceramida interfiere en la ruta de señalización de la insulina inactivando Akt/PKB y posiblemente su translocación al núcleo tal y como proponen Salinas y col. [33] causando una disminución en la expresión del factor de transcripción C/EBP α necesario para la expresión génica de GLUT4.

En conclusión, la secreción de TNF-alfa por el tejido adiposo blanco de personas obesas relaciona la obesidad con el desarrollo de resistencia a la insulina. Esta citoquina activa esfingomielinasas a corto plazo produciendo ceramidas, mientras que a largo plazo tiene efectos lipolíticos en el tejido adiposo generando ácidos grasos libres necesarios para la síntesis de ceramidas. Estas ceramidas podrían mediar la resistencia a la insulina en células musculares y en adipocitos blancos tal y como ha sido propuesto, y como exponemos en este trabajo en los adipocitos marrones. El mecanismo por el que las ceramidas producen resistencia a la insulina en adipocitos marrones es porque mantienen Akt/PKB en un estado inactivo y defosforilado, impidiendo su función fisiológica en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y en la expresión génica de GLUT4. Además, como las ceramidas producen apoptosis en muchos tipos celulares, podrían causar apoptosis en las células beta pancreáticas, un sistema celular donde los ácidos grasos inhiben la supervivencia. Esta situación podría contribuir a la patogénesis de la Diabetes tipo 2 en pacientes obesos.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo se ha realizado con la ayuda de un proyecto de la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Programa Sectorial de PGC. Ministerio de Ciencia y Tecnología. PM98/0082. Rosario Hernandez disfruta de una beca de FPU del Ministerio de Educación y Cultura. Teresa Teruel es becaria postdoctoral de la Comunidad Autónoma de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) PESSIN, J.E. AND SALTIEL, A.R. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 106:165-169.
- (2) KAHN, C.R., VICENT, D. AND DORIA, A. (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu.Rev.Med.* 47:509-531.

- (3) ACCILI, D., DRAGO, J., LEE, E.J., JOHNSON, M.D., COOL, M.H., SALVATORE, P., ASICO, L.D., JOSE, P.A., TAYLOR, S.I. AND WESTPHAL, H. (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat.Genet.* 12: 106-109.
- (4) BRUNING, J.C., MICHAEL, M.D., WINNAY, J.N., HAYASHI, T., HORSCH, D., ACCILI, D., GOODYEAR, L.J. AND KAHN, C.R. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569.
- (5) GUERRA, C., NAVARRO, P., VALVERDE, A.M., ARRIBAS, M., BRUNING, J., KOZAK, L.P., KAHN, C.R. AND BENITO, M. (2001) Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108: 1205-1213.
- (6) FERNANDEZ, A.M., KIM, J.K., YAKAR, S., DUPONT, J., HERNANDEZ-SANCHEZ, C., CASTLE, A.L., FILMORE, J., SHULMAN, G.I. AND LE ROITH, D. (2001) Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev* 15:1926-1934.
- (7) ZISMAN, A., PERONI, O.D., ABEL, E.D., MICHAEL, M.D., MAUVAIS-JARVIS, F., LOWELL, B.B., WOJTASZEWSKI, J.F., HIRSHMAN, M.F., VIRKAMAKI, A., GOODYEAR, L.J., KAHN, C.R. AND KAHN, B.B. (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6:924-928.
- (8) ABEL, E.D., PERONI, O., KIM, J.K., KIM, Y.B., BOSS, O., HADRO, E., MINNEMANN, T., SHULMAN, G.I. AND KAHN, B.B. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733.
- (9) KAHN, B.B. AND FLIER, J.S. (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481.
- (10) VIRKAMAKI, A., UEKI, K. AND KAHN, C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 103:931-943.
- (11) SALTIEL, A.R. AND KAHN, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- (12) STEPPAN, C.M. AND LAZAR, M.A. (2002) *Resisting and obesity-associated insulin resistance.* Trends Endocrinol Metab 13:18-23.
- (13) HOTAMISLIGIL, G.S. (1999) *Mechanisms of TNF-alfa-induced insulin resistance* [see comments]. Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes 107:119-125.

- (14) UYSAL, K.T., WIESBROCK, S.M., MARINO, M.W. AND HOTAMISLIGIL, G.S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610-614.
- (15) RUI, L., AGUIRRE, V., KIM, J.K., SHULMAN, G.I., LEE, A., CORBOULD, A., DUNAIF, A. AND WHITE, M.F. (2001) Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 107:181-189.
- (16) PERREAULT, M. AND MARETTE, A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-1143.
- (17) YUAN, M., KONSTANTOPOULOS, N., LEE, J., HANSEN, L., LI, Z.W., KARIN, M. AND SHOELSON, S.E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 293:673-1677.
- (18) KIM, J.K., KIM, Y.J., FILLMORE, J.J., CHEN, Y., MOORE, I., LEE, J., YUAN, M., LI, Z.W., KARIN, M., PERRET, P., SHOELSON, S.E. AND SHULMAN, G.I. (2001) Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-446.
- (19) OLEFSKY, J.M. (2000) Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J Clin Invest* 106:467-472.
- (20) PARK, K.S., CIARALDI, T.P., LINDGREN, K., ABRAMS-CARTER, L., MUDALIAR, S., NIKOULINA, S.E., TUFARI, S.R., VEERKAMP, J.H., VIDAL-PUIG, A. AND HENRY, R.R. (1998) Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:2830-2835.
- (21) FURNSINN, C., BRUNMAIR, B., MEYER, M., NESCHEN, S., FURTMULLER, R., RODEN, M., KUHNLE, H.F., NOWOTNY, P., SCHNEIDER, B. AND WALDHAUSL, W. (1999) Chronic and acute effects of thiazolidinediones BM13.1258 and BM15.2054 on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Br.J.Pharmacol.* 128:1141-1148.
- (22) TERUEL, T., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1996) Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem.J.* 319:627-632.
- (23) VALVERDE, A.M., NAVARRO, P., TERUEL, T., CONEJO, R., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1999) Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem.J.* 337:397-405.
- (24) BANDYOPADHYAY, G., STANDAERT, M.L., SAJAN, M.P., KARNITZ, L.M., CONG, L., QUON, M.J. AND FARESE, R.V. (1999) Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

- and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta. *Mol.Endocrinol.* 13:1766-1772.
- (25) VALVERDE, A.M., LORENZO, M., NAVARRO, P., MUR, C. AND BENITO, M. (2000) Okadaic acid inhibits insulin-induced glucose transport in fetal brown adipocytes in an Akt-independent and protein kinase C zeta-dependent manner. *FEBS Lett.* 472:153-158.
- (26) VALVERDE, A.M., TERUEL, T., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Tumor necrosis factor- α causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin-induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 139:1229-1238.
- (27) SMITH, U., CARVALHO, E., MOSIALOU, E., BEGUINOT, F., FORMISANO, P. AND RONDINONE, C. (2000) PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 268: 315-320.
- (28) HERNANDEZ, R., TERUEL, T. AND LORENZO, M. (2001) Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett* 494:225-231.
- (29) POWELL, K.A., CAMPBELL, L.C., TAVARE, J.M., LEADER, D.P., WAKEFIELD, J.A. AND GOULD, G.W. (1999) Trafficking of Glut4-green fluorescent protein chimaeras in 3T3-L1 adipocytes suggests distinct internalization mechanisms regulating cell surface glut4 levels. *Biochem.J.* 344:535-543.
- (30) LONG, S.D. AND PEKALA, P.H. (1996) Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 319:179-184.
- (31) TERUEL, T., HERNANDEZ, R. AND LORENZO, M. (2001) Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50:2563-2571.
- (32) JAIN, R., POLICE, S., PHELPS, K. AND PEKALA, P.H. (1999) Tumour necrosis factor- α regulates expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs) α and β and determines the occupation of the C/EBP site in the promoter of the insulin-responsive glucose-transporter gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 338:737-743.
- (33) SALINAS, M., LOPEZ-VALDALISO, R., MARTIN, D., ALVAREZ, A. AND CUADRADO, A. (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol.Cell Neurosci* 15:156-169.

Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

Artículo Original _____

Respuesta de las arterias pulmonares de lechón al óxido nítrico y a dadores de óxido nítrico: Evolución con la edad postnatal y modulación por el estrés oxidativo*

FRANCISCO PÉREZ-VIZCAÍNO, ÁNGEL L COGOLLUDO, JOSÉ GUSTAVO LÓPEZ-LÓPEZ, FRANCISCO ZARAGOZÁ-ARNÁEZ, MANUEL IBARRA.

Departamento de Farmacología. Instituto de Farmacología y Toxicología (CSIC-UCM). Facultad de Medicina. Universidad Complutense

RESUMEN

En el presente estudio hemos analizado la influencia de la edad postnatal y los cambios en el nivel de estrés oxidativo sobre la vasodilatación pulmonar *in vitro* inducida por el NO endógeno, el NO exógeno y donadores de NO. Se han utilizado las arterias pulmonares procedentes de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad para el registro de la fuerza contráctil. En las arterias pulmonares de lechones de 1 y 15 días de edad, el estrés oxidativo basal

* Premio Cepa Schwarz Pharma, S.L de la Real Academia de Farmacia. Año 2001

modula la acción vasodilatadora del NO, siendo la NAD(P)H oxidasa de la adventicia la principal fuente endógena del anión superóxido. La vasodilatación inducida por el NO de origen endotelial y por el NO exógeno aumenta con la edad, posiblemente por un incremento en la actividad de la ciclooxigenasa-1 en los primeros momentos de vida extrauterina que modularía el efecto vasodilatador del NO. Finalmente, encontramos que el NO y los donadores de NO, SNAP y nitroprusiato (SNP), difieren en la cinética y distribución regional de la liberación del NO, lo que influye en la susceptibilidad para la inactivación por el anión superóxido y por la oxihemoglobina.

Palabras clave: Óxido nítrico, neonato, arterias pulmonares, superóxido.

SUMMARY

Nitric oxide- and nitric oxide donor-induced responses in piglet pulmonary arteries: Postnatal maturation and modulation by oxidative stress

We have analyzed the influence of postnatal age and oxidative stress on the *in vitro* pulmonary vasodilator activity of nitric oxide and nitric oxide donors. Isolated pulmonary arteries from 1 d and 2 week old piglets were mounted for isometric force recording. Basal oxidative stress modulated the vasodilator activity of nitric oxide, being the adventitial NADPH oxidase the main endogenous source of superoxide anion. Endogenous and exogenous NO-induced vasodilatation increased with age, possibly through an increased cyclooxygenase-1 activity during the first hours of extrauterine life which could inactivate NO. Finally, we found that NO and the NO donors SNP and SNAP not only showed different kinetics and regional distribution of NO release but also a different susceptibility to be inactivated by superoxide and oxyhemoglobin.

Keywords: Nitric oxide, newborn, pulmonary arteries, superoxide

INTRODUCCIÓN

Furchgott y Zawadzki (1980) descubrieron que las células endoteliales producían un factor que inducía relajación en arterias aisladas en respuesta a la acetilcolina (ACh). A esta sustancia o al conjunto de sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio se las denominó EDRF. Posteriormente, Ignarro y cols. (1987), Palmer y cols. (1987) y Furchgott (1988), de manera independiente, demostraron que las acciones fisiológicas y farmacológicas del EDRF podrían ser atribuidas al NO. Actualmente, sabemos que el NO es uno de los principales mediadores fisiológicos endógenos a nivel vascular, que presenta propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas.

El NO posee un electrón desapareado por lo que puede considerarse un radical libre. Por ello, tiene capacidad para reaccionar rápidamente con otras moléculas, que tienen también electrones desapareados, principalmente, otros radicales libres y metales de transición. Por su gran reactividad, el NO tiene una corta semivida, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el organismo, este mediador puede reaccionar con la hemoglobina (Hb), activar la guanilato ciclasa soluble (GCs), o transformarse en peroxinitrito (ONOO⁻) tras reaccionar con el anión superóxido (O₂⁻).

Mecanismo de la relajación producida por el NO. El efecto relajante del NO se produce, fundamentalmente, a través de la activación de la GCs, y el consecuente incremento de los niveles del GMPc citosólico en las CMLV (Barnes y Liu, 1995). Una concentración de NO de tan sólo 10 nM es suficiente para activar la GCs. El GMPc reduce [Ca²⁺]_i por medio de diferentes mecanismos (Woodrum y cols., 1999), aunque también se ha descrito que el GMPc induce relajación por mecanismos independientes de cambios en la [Ca²⁺]_i (Karakaki y cols., 1997).

La disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el GMPc puede estar mediada por: a) la activación de la SERCA a través de la fosforilación del fosfolambano, b) la regulación en la fosforilación y activación de la PMCA, c) el cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC), d) la inhibición de la liberación de Ca^{2+} del RS inducido por IP_3 debido a la fosforilación de sus receptores, e) la activación de la ATPasa Na^+/K^+ , f) la activación de distintos canales de K^+ activados por Ca^{2+} , regulados por los niveles celulares de ATP o que presentan rectificación tardía y g) la estimulación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

Papel del NO en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto. La actividad del NO endotelial pulmonar del cordero (Abman y cols., 1990) y del cerdo (Liu y cols., 1992) aumenta tras el nacimiento (Abman y cols., 1991). La administración de L-NAME, un inhibidor de la síntesis de NO, en ovejas preñadas, produce un aumento del tono arterial pulmonar fetal (Abman y cols., 1990). Si a continuación se practica una cesárea y se suprime la circulación placentaria, se puede observar como aparece una elevación persistente de la presión arterial pulmonar en los fetos tratados con L-NAME, lo que confirma el papel del NO en la transición de la circulación pulmonar fetal a la del adulto (Fineman y cols., 1995). De hecho, se ha descrito que los principales procesos implicados en la vasodilatación pulmonar postnatal, como el aumento de la PaO_2 , el incremento del flujo sanguíneo y el estiramiento mecánico pulmonar, estimulan la liberación de NO endotelial.

Fuentes endógenas de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Durante el proceso de fosforilación oxidativa se forman ERO con diferente estabilidad en el medio; por ejemplo, el O_2^- es eliminado a gran velocidad ($2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) por la SOD, mientras que el H_2O_2 es más estable y puede difundir a través de la membrana mitocondrial hacia el citosol. En la membrana plasmática, la fuente enzimática más importante de producción del O_2^- es la NAD(P)H oxidasa fagocítica, que funciona como un sistema de de-

fensa contra los microorganismos. Este multicomponente enzimático cataliza la transferencia de un electrón para reducir el O_2 a O_2^- , con la NAD(P)H como donador de electrones a través de la proteína transmembrana citocromo b_{558} (un complejo heterodimérico de subunidades proteicas $gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$). Recientemente, se ha descrito que la NAD(P)H oxidasa no es exclusiva de las células fagocíticas, puesto que se ha encontrado expresión de la $p22^{phox}$ en la adventicia de las arterias coronarias (Azumi y cols., 1999).

Papel fisiopatológico del estrés oxidativo. Una gran variedad de procesos fisiopatológicos, tales como la hiperglucemia, hiperlipidemia, el estrés hemodinámico o la hipertensión arterial, se han relacionado con niveles elevados de ERO. En condiciones basales, las células regulan la concentración de las ERO por sistemas enzimáticos antioxidantes, tales como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), o la glutatión peroxidasa. Cuando la velocidad de formación de las ERO es mayor que la capacidad neutralizante de los sistemas antioxidantes, se produce una situación de *estrés oxidativo* (Sies, 1999).

Las ERO activan diversas vías de señalización relacionadas con el crecimiento de las CMLV, incluyendo la fosforilación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la inducción de protooncogenes (*c-fos*, *c-myc* y *c-jun*) y la activación del factor de transcripción AP-1. Altas concentraciones de H_2O_2 también se asocian con procesos de apoptosis, que pueden contribuir al remodelado vascular (Touyz, 2000). El O_2^- y el H_2O_2 pueden polimerizar el ácido hialurónico y regular la actividad de metaloproteasas de la matriz del músculo liso vascular (MMP-2 y MMP-9), que degradan los proteoglicanos y el colágeno, produciendo cambios en la estructura vascular

Acción de las especies reactivas de oxígeno en el metabolismo del NO. La vasodilatación dependiente del endotelio está modulada por el balan-

ce entre la concentración del NO y la del O_2^- (Touyz, 2000). El NO reacciona con el O_2^- y forma $ONOO^-$, reduciendo sus efectos vasodilatadores (Thannickal y Fanburg, 2000). En condiciones normales, la concentración del O_2^- está controlada por la SOD, que lo transforma en O_2 y H_2O_2 a una velocidad de $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$. La constante de velocidad de la reacción entre el NO y el O_2^- para generar $ONOO^-$ es más rápida ($6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$), por lo que en situaciones patológicas en que se produce un aumento del O_2^- , como en la hipertensión arterial, se incrementa la degradación del NO.

Hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN). Durante la vida prenatal, la placenta es el órgano encargado de suministrar al feto el oxígeno y los nutrientes. Tras el nacimiento y con la supresión de la circulación placentaria, el pulmón debe realizar la función de intercambio gaseoso. Esta transición conlleva una rápida reducción de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) y un aumento del flujo sanguíneo pulmonar, pasando la circulación pulmonar de ser un circuito del bajo flujo y alta resistencia durante la vida fetal a uno de alto flujo y baja resistencia en el adulto. Cualquier hecho que perturbe esta delicada transición puede conducir al desarrollo de la HPPN. En 1969, Gersony y cols. describieron este cuadro en recién nacidos a término sin cardiopatía. Todos ellos presentaban una presión arterial pulmonar superior a la sistémica y signos de cortocircuito de derecha a izquierda, a través del *ductus arteriosus* y del *foramen ovale*, que conducían a un cuadro de hipoxemia grave. Se ha descrito que la HPPN afecta al 0.1 – 0.5 % de los recién nacidos (Morin y Stenmark 1995) y que la mortalidad oscila entre el 30 y el 40 %.

La HPPN puede ser idiopática o secundaria. La forma idiopática se asocia a una excesiva muscularización del árbol arterial pulmonar, que se inicia antes del parto y que se ve agravada por factores que aparecen durante el mismo o durante los primeros días de vida extrauterina. La HPPN secundaria aparece asociada a cualquier factor que perturbe la ordenada transición de la circulación pulmonar del feto a la del adulto. Sea cual sea su etiología, la HPPN se caracteriza por una elevación de las RVP como consecuencia de un

aumento del tono y/o de cambios en la estructura vascular pulmonar. Este proceso, que puede tener múltiples etiologías, es consecuencia de un desequilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, predominando la acción de estos últimos. Así, la HPPN se ha relacionado con una disminución de la actividad vasodilatadora de la vía del NO/GMPc y/o con un aumento de la actividad vasoconstrictora del tromboxano A_2 (TXA₂) y/o de la endotelina-1 (ET-1).

Tratamiento de la HPPN. Los objetivos del tratamiento de la HPPN son reducir las RVP, mantener la presión arterial sistólica, interrumpir los cortocircuitos de derecha a izquierda y mejorar la saturación de O₂ arterial y el aporte de O₂ a los tejidos. Puesto que la magnitud del cortocircuito de derecha a izquierda no depende sólo de la presión arterial pulmonar, sino del gradiente de presión entre la arteria pulmonar y la aorta, la vasodilatación del territorio sistémico conduce a un empeoramiento del cortocircuito. Por lo tanto, el fármaco ideal debería ser un vasodilatador con selectividad por el territorio pulmonar.

La terapéutica más eficaz y segura debe ir dirigida a controlar el parámetro hemodinámico específico que produce este proceso; es decir, la elevación de las resistencias vasculares pulmonares. La administración de vasodilatadores pulmonares selectivos permitiría reducir la hipertensión pulmonar, corregir el cortocircuito de derecha a izquierda y disminuir la hipoxemia. Sin embargo, los vasodilatadores clásicamente empleados presentan una baja selectividad pulmonar.

En modelos experimentales o en recién nacidos con HPPN se han utilizado diversos vasodilatadores intravenosos, incluyendo el antagonista de los alfa-adrenoceptores tolazolina, las prostaglandinas PGI₂ y PGE₁, el antagonista de Ca²⁺ nifedipino, la ACh, el donador de NO nitroprusiato y el ATP. Aunque no existen estudios aleatorizados y comparados con placebo, los da-

tos clínicos disponibles apuntan a que todos estos fármacos presentan una baja selectividad por el territorio pulmonar.

A comienzos / mediados de los años 90, la administración de NO por vía inhalatoria (NOi) demostró una clara selectividad por el territorio pulmonar y creó grandes expectativas. Sin embargo, los estudios clínicos controlados demostraron que la eficacia del tratamiento con NOi era parcial y que hasta un 40-50% de los recién nacidos no respondía al mismo. Recientemente, Finner y Barrington (2000) han realizado un metaanálisis de los estudios controlados y aleatorizados en los que se ha analizado la eficacia del NOi en esta patología. En este metaanálisis se concluye que el NOi aumenta la PaO₂ en 46.4 mm Hg y reduce la utilización de oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO) en un 15% con respecto al grupo control. Sin embargo, la utilización de NOi no redujo la mortalidad en estos estudios. Más recientemente, el estudio NINOS (The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group, 2000) ha demostrado que el NOi no se asociaba con alteraciones en el desarrollo neurológico o de otras complicaciones médicas tras dos años de seguimiento.

Una de las posibles causas de la menor reactividad vascular al NO es el aumento de la inactivación del NO por el O₂⁻. Diversos factores asociados a la HPPN, tales como la sepsis, el barotrauma, la elevada concentración de O₂ en el aire inspirado u otros factores que estimulan la respuesta inflamatoria conducen a una elevación del estrés oxidativo pulmonar. De hecho, en los últimos años, la alteración de la vía NO/GMPc a nivel pulmonar también se ha correlacionado con un aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, el NOi no está exento de efectos adversos, siendo la metahemoglobina y la formación de ONOO⁻ los principales responsables de su toxicidad. Si a todo lo anterior añadimos que la mortalidad en la HPPN sigue siendo elevada (15-30%) y que con frecuencia este cuadro deja secuelas pulmonares y neurológicas irreversibles, es evidente que debemos seguir investigando para obtener nuevas alternativas terapéuticas.

Dado que la selectividad del NOi por el territorio pulmonar se basa en su acción local más que en una verdadera selectividad tisular, en los últimos años se ha sugerido que el NOi podría sustituirse por otros vasodilatadores administrados por vía inhalatoria. Dentro de los posibles vasodilatadores candidatos a ser empleados destacan la prostaciclina y los dadores de NO. Pero es evidente que el desarrollo de vasodilatadores pulmonares específicos sólo será posible si conocemos los mecanismos que regulan el tono vascular pulmonar y que participan en la respuesta vasodilatadora al NO.

Por todo lo anterior, en la presente trabajo nos propusimos los siguientes **Objetivos**:

1. Analizar la influencia de diversos factores sobre la vasodilatación pulmonar *in vitro* inducida por el NO exógeno, tales como:

- a) la edad postnatal.
- b) el nivel de estrés oxidativo y su origen vascular.
- c) la actividad de la fosfodiesterasa V.

2. Comparar la vasodilatación inducida por el NO exógeno con la de dos donadores de NO, el SNP y el SNAP, analizando las posibles diferencias existentes en:

- a) la liberación de NO, así como la cinética y la potencia de relajación vascular pulmonar.
- b) su mecanismo de acción.
- c) la susceptibilidad a la inactivación por oxihemoglobina y anión superóxido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se han utilizado las arterias procedentes de lechones de raza híbrida Landrace-Largewhite de 1 día y de 2 semanas de edad. Se disecaron las arterias pulmonares de la tercera rama (0.5 – 1.5 mm de diámetro interno) y posteriormente, se eliminaron el tejido conectivo y adiposo que rodeaban las arterias, para después cortar los vasos en anillos de unos 2-3 mm de longitud.

Registro de contractilidad. Los anillos arteriales se montaban en cámaras de doble pared termostatizadas a 37 °C, que contenían solución de Krebs-Henseleit, burbujeada con mezcla carbógena (95% O₂ y 5% CO₂). Los anillos se montaban entre dos alambres de acero inoxidable con forma de L, uno de los cuales se fijaba a la copa y el otro a un transductor isométrico (GRASS Instruments, modelo FT03), acoplado a un preamplificador (GRASS, modelo 7P1JK) y a un amplificador (GRASS, modelo 7DAHJK). La fuerza contráctil se registraba mediante un convertidor analógico-digital (ADInstruments, modelo PowerLab/800). A los anillos se les aplicaba una tensión basal de 0.3 g (arterias pulmonares de animales de 1 día de edad), 0.5 g (arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad). En estas condiciones, las preparaciones se dejaban estabilizar durante un periodo de 60-90 minutos.

Registro de NO. Para medir la concentración de NO en la solución de Krebs-Henseleit, se utilizaba un electrodo amperométrico (WPI, modelo ISO-NOP). Para preparar la solución saturada de NO se procedía de la siguiente manera: un vial que contenía 20 ml de solución de Krebs-Henseleit, era burbujeado durante 15 minutos con Slope (95% de N₂; 5% de CO₂) y, poste-

riormente, con NO (450 ppm) durante 5 minutos. En estas condiciones, la concentración de NO presente fue de $8.9 \pm 0.5 \times 10^{-7}$ M (n = 4).

Eliminación del endotelio. La eliminación del endotelio se realizaba haciendo pasar un alambre de acero por la luz del anillo y frotándose la pared interna del vaso. La ausencia del endotelio se comprobaba observando la incapacidad de la ACh (10^{-7} M) para relajar los anillos precontraídos con NA (10^{-6} M).

Cambios en la orientación de la adventicia del anillo arterial. Con el fin de determinar la localización de la fuente generadora del O_2^- , algunos anillos arteriales se invertían de tal forma que la adventicia quedaba orientada hacia dentro. A otro grupo de anillos se les realizó la maniobra de inversión 2 veces y de esta manera la adventicia quedaba orientada de nuevo hacia fuera.

Curvas concentración-respuesta a NO. Al final del periodo de estabilización se añadía al baño de órganos un análogo de TXA_2 , el U46619. El aumento de tensión alcanzaba valores estables al cabo de 20 minutos y, posteriormente, se añadía su correspondiente vehículo. Al cabo de unos 15 minutos se adicionaban volúmenes crecientes de solución saturada de NO, que equivalían a concentraciones crecientes del mismo (2×10^{-10} , 5×10^{-10} , 2×10^{-9} , 5×10^{-9} , 2×10^{-8} , 5×10^{-8} y 2×10^{-7} M).

Curvas concentración-respuesta a ACh, 8-bromo-GMP cíclico, nitroprusiato sódico (SNP) y SNAP. Tras el periodo de estabilización se inducía la respuesta contráctil al U46619 (10^{-7} M). En estas condiciones, se realizaba la curva concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones crecientes y acumulativas de ACh (10^{-9} M - 3×10^{-6} M), 8-Br-GMPc (10^{-5} M - 10^{-3} M), SNAP o de SNP (10^{-9} M - 3×10^{-5} M). Las curvas se realizaron en presencia de vehículo o de alguno de los siguientes fármacos:

A) un inhibidor de la vía NO/GMPc: el ODQ (10^{-6} M), B) un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA): la tapsigargina (2×10^{-6} M), C) antioxidantes: SOD (100 U/ml), MnCl_2 (10^{-4} M), MnTMPyP (10^{-4} M), D) prooxidantes: DETCA (10^{-3} M) o el complejo formado por xantina oxidasa (5 mU/ml)/hipoxantina (10^{-4} M), E) oxihemoglobina (3×10^{-7} M), F) inhibidores de las vías enzimáticas que generan el anión superóxido: DPI (difenilene iodonio, 10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M), indometacina (10^{-5} M), oxipurinol (10^{-7} M) o rotenona (5×10^{-5} M), se realizó para inhibir la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la xantina oxidasa y la cadena de transporte electrónico mitocondrial, respectivamente (Thannickal y Fanburg, 2000).

Relajación inducida por concentraciones únicas de NO en ausencia y en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa-V, dipiridamol. Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de la PDE-V sobre el tiempo de recuperación al 50% del efecto relajante del NO ($t_{1/2}$), las preparaciones se pretrataban con dipiridamol (10^{-6} M). En estos experimentos, se añadía el dipiridamol y 15 minutos después el NO (2×10^{-7} M).

Fármacos. En el presente trabajo se han utilizado los siguientes fármacos: (-) bitartrato de noradrenalina, cloruro de acetilcolina, tapsigargina, 8-bromo-GMPc, nitroprusiato sódico, MnCl_2 , hipoxantina (HX), xantina oxidasa (XO), DETCA (ácido dietil-ditiocarbámico), nitrito de sodio, estaurosporina, indometacina, oxipurinol, rotenona, DPI (difenileneiodonio), Hb (de eritrocitos humanos), SOD (superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos) y L-NAME. Todos ellos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., (Alcobendas, España). MnTMPyP (Mn[III] tetrakis [1-metil-4piridil] porfirina), U46619 (9,11 dideoxi-11 α , 9 α -epoximetano-prostaglandina F2 α disuelto en metil acetato) y SNAP (S-Nitrosol N-acetil-D,L-penicilamina) fueron obtenidos de Alexis Corporation (Läufelfingen, Alemania). El ODQ (1H-[1,2,4,] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-ona) fue obtenido de Tocris Cookson Ltd

(Bristol), el SKF525A de RBI (Smith Kline Beecham, UK) y el AA861 de Takeda (Japón).

Análisis de los resultados. Los resultados se expresan como media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) para un determinado número de anillos arteriales (n) de distintos animales. Las curvas concentración-respuesta para la acetilcolina, el SNP, el SNAP y se ajustaron la ecuación logística, donde el pD_2 es la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50 % del E_{max} , expresado como logaritmo negativo de dicha concentración. Las curvas concentración-respuesta a NO se ajustaron a una recta por el método de mínimos cuadrados. A partir de este ajuste se obtuvo el pIC_{30} . Los resultados experimentales y controles se contrastaron comparando las medias mediante el análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía seguido del test de Newman-Keuls. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que la P fue menor de 0.05.

RESULTADOS

Efecto vasodilatador del NO y detección simultánea de su concentración. En animales de dos semanas de edad, una vez que el efecto contráctil del U46619 había alcanzado un valor estable, la adición de concentraciones crecientes de NO producía una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente ($pIC_{30} = 7.23 \pm 0.03$, $n = 12$, 1 día de edad). El efecto relajante del NO era inmediato, pero transitorio, puesto que una vez que había alcanzado el efecto máximo, la respuesta contráctil producida por el U46619 se recuperaba paulatinamente en pocos minutos. El NO detectado mediante el electrodo colocado en el baño de órganos desaparecía del medio con una cinética monoexponencial (presentando una semivida de aproximadamente 15 segundos).

Influencia de la edad sobre el efecto relajante de la acetilcolina en ausencia y presencia de L-NAME. La acetilcolina producía una relajación concentración-dependiente en las arterias pulmonares de animales de 1 día y de 2 semanas de edad. Los resultados observados con la ACh fueron semejantes a los obtenidos con la administración del NO exógeno. En las curvas concentración-respuesta, se observó como la ACh fue más potente y eficaz en las arterias procedentes de lechones de 2 semanas con respecto a las obtenidas de lechones de 1 día de edad (tabla 1). Cuando se inhibió la producción de NO endógeno tras el pretratamiento con L-NAME (10^{-4} M), se observó que se producía una inhibición total del efecto relajante de la ACh en preparaciones de animales de 1 día y de 2 semanas de edad.

Tabla 1. Potencia y eficacia del efecto vasodilatador de acetilcolina en las arterias pulmonares de los lechones de 1 día y de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (10^{-7} M).			
pD₂		E_{max} (%)	
1 Día	2 Semanas	1 Día	2 Semanas
6.60 ± 0.14 (n = 14)	7.01 ± 0.05* (n = 11)	42 ± 6	64 ± 1*

*p<0.05 vs arterias pulmonares de animales de 1 día.

Evolución con la edad del efecto del 8-Br-GMP cíclico. El 8-Br-GMPc producía un efecto relajante concentración-dependiente similar en las arterias pulmonares de lechones de 1 día (pIC₃₀= 3.92 ± 0.22) y de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (pIC₃₀= 3.89 ± 0.21).

Cambios inducidos por la inhibición de la fosfodiesterasa tipo V.

En condiciones control, en las arterias pulmonares de lechones de 1 día de edad el tiempo de recuperación del efecto relajante al 50% ($t_{1/2}$) fue de 1.4 ± 0.1 minutos ($n = 6$), mientras que en preparaciones de lechones de 2 semanas de edad la $t_{1/2}$ fue significativamente mayor (2.9 ± 0.2 minutos, $p < 0.001$, $n = 9$). Cuando las preparaciones de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad se trataban con el dipiridamol, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo V, la $t_{1/2}$ aumentaba significativamente ($p < 0.01$), alcanzando los valores de 4.8 ± 0.2 minutos ($n = 9$) y 9.6 ± 1.1 minutos ($n = 8$), respectivamente.

Efecto de diversos agentes antioxidantes y prooxidantes sobre la vasodilatación inducida por el NO. El pretratamiento con la superóxido dismutasa (SOD) desplazaba la curva de relajación del NO hacia la izquierda tanto en arterias de animales de 1 día ($pIC_{30} = 7.67 \pm 0.17$, $n = 7$) como de 2 semanas de edad (tabla 2). Sin embargo, en éstas últimas, no modificaba la concentración del NO detectado mediante el electrodo con respecto a los valores obtenidos en arterias control. De forma semejante, el mimético de la SOD $MnCl_2$ potenciaba el efecto relajante del NO en arterias pulmonares de lechones de ambas edades (tabla 6). En las arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad, otro mimético de la SOD, el $MnTMPyP$, desplazaba ligeramente hacia la izquierda la curva concentración-respuesta al NO; sin embargo el valor del pIC_{30} no mostró diferencia significativa con respecto a la curva control (tabla 2) en ningún caso.

Tabla 2. Parámetros de las curvas concentración-respuesta a NO, SNAP y SNP en presencia de oxihemoglobina y de diferentes agentes antioxidantes o prooxidantes en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad precontraídas con U46619 (10^{-7} M).					
	NO	SNAP		SNP	
	pIC ₃₀	PD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}
Control	7.63 ± 0.09 (n=14)	6.97 ± 0.06 (n=10)	69 ± 6	6.21 ± 0.07 (n=10)	72 ± 9
Oxihemoglobina (3 x10 ⁻⁷ M)	6.88 ± 0.07** (n=6)	6.20 ± 0.09** (n=6)	68 ± 5	6.31 ± 0.17 (n=6)	66 ± 6
SOD (100 U/ml)	8.62 ± 0.16* (n=9)	7.18±0.11 (n=9)	77 ± 6	5.89 ±0.20* (n=6)	79 ± 9
<i>MnTMPyP</i> (10 ⁻⁴ M)	8.05 ± 0.16 (n=5)	--	--	--	--
MnCl ₂ (10 ⁻⁴ M)	8.17 ± 0.14* (n=8)	7.01 ± 0.11 (n=10)	76 ± 6	5.94±0,33 (n=5)	64 ± 3
XO (5mU/mL)/ HX (10 ⁻⁴ M)	7.91 ± 0.16* (n=6)	6.91 ± 0.11 (n=11)	98 ± 5	5.38±2.31 n=10)	72 ± 5
DETCA (10 ⁻³ M)	6.66 ± 0.36* (n=8)	5.99 ± 0.11* (n=9)	95 ± 8*	6.01±0.15 (n=7)	65±11

*p<0.05 control vs tratamiento.

**p<0.01 control vs tratamiento.

En el presente estudio hemos utilizado dos procedimientos experimentales para aumentar la concentración del O_2^- en el medio de incubación: a) la XO enzima que genera el O_2^- como producto de la conversión de la HX en ácido úrico y b) el DETCA, el cual inhibe la SOD. El bloqueo de la SOD tras la administración del DETCA ($pIC_{30} = 6.05 \pm 0.17$, $n = 7$) o del complejo XO/HX ($pIC_{30} = 6.0 \pm 0.22$, $n = 6$) producía una inhibición significativa del efecto relajante del NO en las arterias pulmonares de lechones de 1 día y de 2 semanas de edad (tabla 2). Cuando analizábamos la concentración de NO detectado por el electrodo, podíamos observar que el DETCA no modificaba la detección con respecto al valor control, mientras que el complejo XO/HX lo disminuía de manera significativa.

Efecto del DPI, L-NAME, indometacina, oxipurinol, SKF525A, AA861 y la rotenona sobre la vasodilatación inducida por el NO. El DPI desplazaba hacia la izquierda la curva concentración-respuesta a NO, reduciendo de forma significativa el valor del pD_2 tanto en las arterias pulmonares de los lechones de 1 día ($pIC_{30} = 7.5 \pm 0.05$, $n = 5$), como en las obtenidas de los animales de 2 semanas de edad ($pIC_{30} = 8.13 \pm 0.03$, $n = 5$). Los restantes inhibidores enzimáticos ensayados, no modificaban el efecto relajante del NO de manera significativa en las arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad. Por el contrario, como muestra la figura 1, en las arterias pulmonares procedentes de los lechones de 1 día de edad, la indometacina potenciaba el efecto relajante del NO de manera significativa. Sin embargo, el pretratamiento con indometacina no modificaba la respuesta vasodilatadora del NO en arterias pulmonares procedentes de lechones de 2 semanas de edad (figura 1). También se observó en arterias pulmonares procedentes de los lechones de 1 día de edad una potenciación del efecto del NO con el pretratamiento con otro inhibidor de la COX, el meclofenamato (10^{-5} M) y con el inhibidor selectivo de la COX-1, el ácido acetilsalicílico (5×10^{-5} M). Sin embargo, el

inhibidor selectivo de la COX-2 (NS398, 10^{-5} M) no produjo cambios significativos.

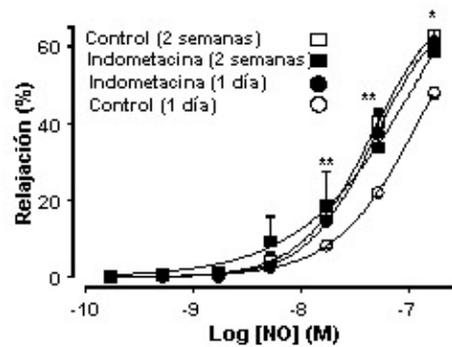


Figura 1. Efecto relajante del NO en las arterias pulmonares sin endotelio de los lechones de 1 día y de 2 semanas de edad, pretratadas con indometacina (10^{-5} M). Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m. de 6-14 experimentos. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ arterias control vs arterias tratadas con indometacina (animales de 1 día).

Efecto de los cambios en la orientación de la adventicia del anillo arterial. En el grupo de experimentos realizado en arterias pulmonares invertidas, las curvas concentración-respuesta a NO se desplazaron hacia la iz-

quiera. Este hecho se observó tanto en las preparaciones de los animales de 1 día ($pIC_{30} = 7.90 \pm 0.08$, $n = 6$), como en las de los de 2 semanas de edad ($pIC_{30} = 8.25 \pm 0.01$, $n = 5$). En estas arterias invertidas, al contrario de lo que se observaba con los respectivos controles, el pretratamiento con DPI no modificaba las curvas de relajación al NO. Sin embargo, en aquellos anillos en los que se realizó la doble maniobra de inversión, la curva concentración-respuesta a NO, no fue distinta de la observada en las arterias control.

Cinética de la relajación producida por el NO, SNAP y SNP en las arterias pulmonares de lechón. En la figura 2 se muestra cómo el NO producía su efecto vasodilatador máximo antes que los donadores de NO y cómo la recuperación de la contracción era también más rápida (26 ± 2 s, $n = 3$). La respuesta vasodilatadora máxima del SNP era la más lenta y también la que más tardaba en recuperarse (250 ± 12 s, $n = 3$). Mientras que la cinética de la respuesta del SNAP (86 ± 8 s, $n=3$). se encontraba situada entre la del NO y la del SNP.

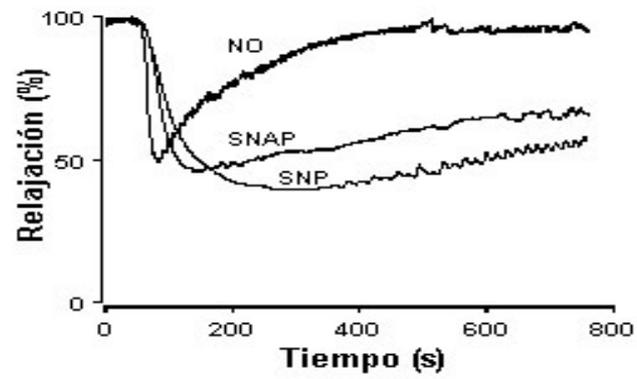
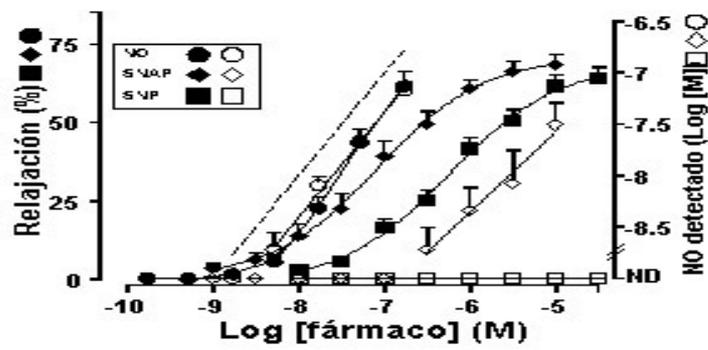


Figura 2. Curso temporal del efecto relajante del NO comparado con el de los donadores de NO, SNAP y SNP, en las arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.

Comparación del efecto relajante del NO respecto al producido por los donadores de NO, SNAP y SNP, en las arterias pulmonares de lechón. Ambos donadores (SNAP y SNAP producían un efecto relajante concentración-dependiente alcanzándose un efecto máximo semejante (figura 3 y Tabla 2). Con respecto a la potencia, se puede observar cómo el NO, es ligeramente más potente que el SNAP, y éste a su vez más potente que el SNP. Sólo se detectaba NO cuando se añadían concentraciones de SNAP superiores a 10^{-7} M, aunque a esas concentraciones producía una relajación de casi un 40% de la contracción. La adición del SNP produjo vasodilatación a concentraciones superiores a 10^{-8} M, no detectándose aumentos en la concentración de NO.



Mecanismos de vasodilatación del NO, SNAP, y SNP en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.

Con el fin de analizar la participación de la GCs en el mecanismo de relajación producida por el NO, el SNAP y el SNP, realizamos las correspondientes curvas concentración-respuesta en presencia de ODQ (10^{-6} M). En arterias pulmonares de lechón, se ha descrito que la activación de la SERCA es uno de los mecanismos de relajación del SNP (Cogolludo y cols., 2001); por esta razón, realizamos también curvas concentración-respuesta a NO, a SNAP y a SNP en presencia de tapsigargina (2×10^{-6} M), un inhibidor de la SERCA. El ODQ eliminaba casi completamente el efecto relajante del NO, del SNAP y del SNP (figura 31). En presencia de tapsigargina, el efecto vasodilatador del NO se inhibió a casi todas las concentraciones estudiadas. De forma similar, la tapsigargina inhibió los efectos relajantes del SNP y del SNAP. Los parámetros referentes a la potencia de relajación y eficacia del SNP, del SNAP y del NO en ausencia y presencia de los tratamientos mencionados, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de las curvas concentración-respuesta a NO, a SNAP y a SNP en presencia de tapsigargina en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de edad.					
	NO	SNAP		SNP	
	pIC ₃₀	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}
Control	7.63 ± 0.09 (n = 14)	6.59 ± 0.11 (n = 10)	70 ± 5	6.21 ± 0.07 (n = 10)	72 ± 9
Tapsigargina (2×10^{-6} M)	7.17 ± 0.04* (n = 11)	6.17 ± 0.21** (n = 6)	46 ± 9*	6.0 ± 0.18 (n = 7)	48 ± 9*

*p<0.05 control vs tratamiento.

**p<0.01 control vs tratamiento.

Efectos de la oxihemoglobina, la SOD, el $MnCl_2$, el complejo XO/HX y el DETCA sobre la vasodilatación inducida por el NO, SNAP y SNP en las arterias pulmonares de lechón. Como se observa en la figura 4, la oxihemoglobina produjo una marcada inhibición de la respuesta a NO. Sin embargo, no afectó a la respuesta a SNP y sólo débilmente a la respuesta a SNAP. Los resultados obtenidos con el DETCA, el complejo XO/HX, la SOD y el $MnCl_2$ sugieren que la reducción del efecto vasodilatador del NO fue debida al aumento del O_2^- . Por el contrario, el aumento del efecto vasodilatador pudo ser debido a la disminución del O_2^- . Este hecho nos indicaría que en nuestras condiciones experimentales, el O_2^- presente en el medio de incubación reaccionaría con el NO y de esta forma disminuiría su efecto vasodilatador. Por esta razón, decidimos comparar el efecto vasodilatador del NO con el de los donadores de NO en presencia de agentes prooxidantes y antioxidantes.

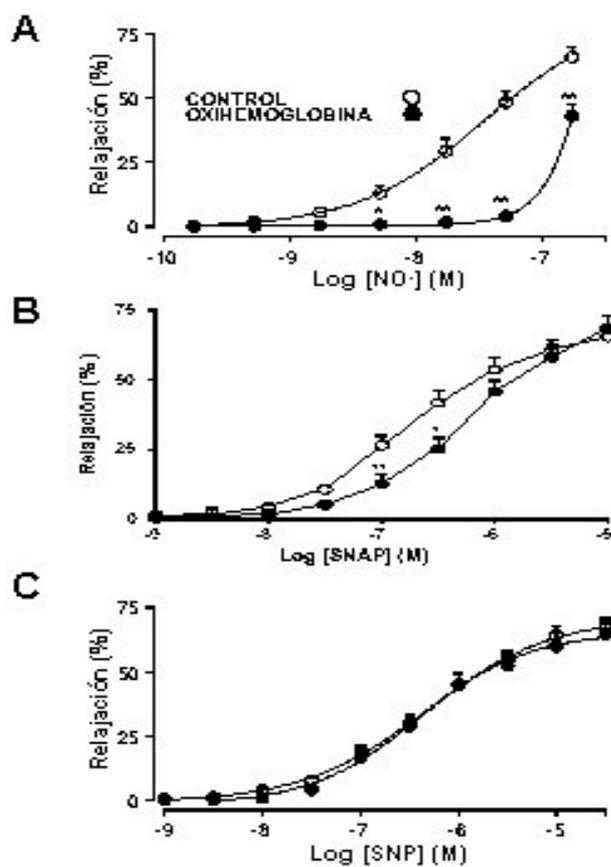
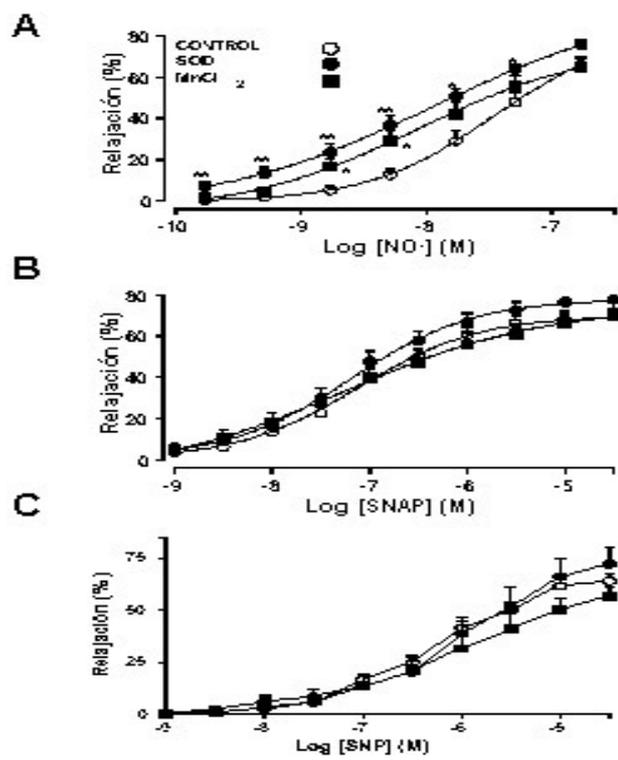


Figura 4.- Efecto relajante del NO (A) comparado con el producido por dos donadores de NO, el SNAP (B) y el SNP (C), en arterias pulmonares de lechón de 2 semanas de edad contraídas con U46619 (10^{-7} M) y pretratadas con oxihemoglobina (3×10^{-7} M). Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m de 5-14 experimentos (ver Tabla 6). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ control vs oxihemoglobina

Tanto la SOD como su mimético, el $MnCl_2$, no modificaban la curva concentración-respuesta al SNAP y SNP (figura 5), pero sí que potenciaban la vasodilatación producida por el NO. En presencia del complejo XO/HX, o tras la inhibición de la SOD con el DETCA, el efecto vasodilatador se inhibió de forma significativa. La curva concentración-respuesta al SNAP se desplazó ligeramente hacia la derecha tras el tratamiento con DETCA y se acompañó de una reducción significativa del valor del pD_2 . Sin embargo, no se observaban cambios tras la administración del complejo XO/HX. Ninguno de estos pretratamientos modificó la curva concentración-respuesta al SNP (tabla 2).





DISCUSIÓN

Modelo experimental: lechones de 1 y 15 días de vida. Nuestros experimentos se realizaron en arterias pulmonares de lechón, ya que la especie porcina es ampliamente utilizada como modelo experimental de distintas patologías a nivel pulmonar, incluyendo la HPPN. De hecho, el desarrollo anatómico y funcional pulmonar porcino durante el periodo perinatal es muy similar al del humano (Sánchez-Luna y cols., 1993). La elección de animales de 1 día de vida se debe a que durante esta etapa, los recién nacidos son más susceptibles a desarrollar la HPPN. A los 15 días de vida, los animales, aunque siguen siendo considerados recién nacidos (en el hombre se considera recién nacido a un individuo de hasta 28-30 días de edad), su desarrollo pulmonar extrauterino está más avanzado y muestra ya un patrón intermedio entre el del recién nacido y el del adulto. En el presente estudio se han utilizado exclusivamente animales machos con el fin de minimizar la posible variabilidad entre sexos.

El TXA₂ como vasoconstrictor pulmonar: mecanismo y papel fisiopatológico. Durante la vida fetal, el TXA₂ contribuye a la regulación del tono vascular pulmonar y al mantenimiento de la alta resistencia vascular pulmonar necesaria para la fisiología fetal, pero sin duda, más que en situaciones fisiológicas, el TXA₂ desempeña un papel fundamental en situaciones patológicas asociadas a alteraciones pulmonares y en particular a la HPPN,

tanto en modelos experimentales como en la clínica. En los vasos estudiados en el presente estudio, la respuesta contráctil inducida por el análogo de TXA₂ (U46619) era mayor en las preparaciones de animales de 2 semanas con respecto a las de los de 1 día de edad. Las diferencias observadas en la vasoconstricción inducida por el U46619 entre animales de 1 día y de dos semanas de edad podrían estar relacionadas con el hecho de que estos últimos presentaban una mayor masa muscular.

Los receptores activados por TXA₂/PGH₂ (receptores TP) pertenecen a la familia de los receptores de membrana acoplados a proteína G. La activación de dichos receptores conlleva una activación de la fosfolipasa C con el consiguiente aumento de IP₃ y de DAG. La movilización del Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares por efecto del IP₃, así como su entrada por los canales VOC y ROC da lugar a un aumento en la [Ca²⁺]_i necesario para que se produzca la respuesta vasoconstrictora (Cogolludo, 1999). No obstante, también se han descrito mecanismos de contracción independientes del aumento en la [Ca²⁺]_i, que implican un aumento en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺ (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997).

Significado del NO detectado por el electrodo. La semivida del NO en el baño de órganos es muy breve, inferior a 15 s, haciendo difícil que se acumule en la solución, aunque se administren exógenamente cantidades de forma continuada. A pesar de que el límite de detección del NO por el electrodo sea relativamente bajo (1 nM según el fabricante y alrededor de 10 nM en la práctica), lo cierto es que no permite detectar la producción de NO endógeno, a menos que se introduzca el electrodo en la luz del vaso a una distancia muy corta de las células endoteliales. Asimismo, el electrodo no permite detectar los cambios en la concentración de NO, secundarios a alteraciones en el metabolismo, que ocurren dentro del tejido. Por lo tanto, el electrodo detectará el NO añadido y el liberado espontáneamente por donadores de NO al medio, pero no el NO generado por el tejido o los cambios en la concentración de NO que ocurran dentro del mismo. Resumiendo, en princi-

pio, el campo de detección del electrodo se limita a aquellos cambios en la concentración de NO que tienen lugar en el baño de órganos.

Papel del NO endógeno. La administración de L-NAME, un inhibidor de la NOS, produce una respuesta vasoconstrictora en las arterias pulmonares, lo que indica que el NO es liberado por el endotelio en condiciones basales en concentración suficiente para modular el tono vascular. Por otra parte, en todos los tejidos estudiados de animales de ambas edades, la relajación inducida por ACh fue inhibida de forma casi completa por el L-NAME, lo que indica que el efecto relajante dependiente del endotelio está mediado, mayoritariamente, por la liberación de NO. Es decir, el NO desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular *in vitro*, tanto en situación basal como tras el estímulo con agonistas. Estos datos están en concordancia con los observados *in vivo* por Abman y cols. (1990) en fetos y recién nacidos de cordero.

Mecanismo de acción del NO. Existen múltiples mecanismos implicados en la vasodilatación producida por el NO y/o el GMPc. La existencia de mecanismos redundantes indica la importancia de esta vía de vasodilatación. Sin embargo, la importancia relativa de cada uno es distinta según el lecho vascular. Por ello, es necesario caracterizar el papel que desempeña cada mecanismo en el vaso objeto de estudio. El NO produce vasodilatación, fundamentalmente, a través de la estimulación de la GCs con el consiguiente aumento de los niveles de GMPc (Cogolludo y cols., 2001). No obstante, también se han descrito mecanismos de vasodilatación del NO independientes de GMPc (Woodrum y cols., 1999). Así, por ejemplo, el NO puede activar directamente canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK_{Ca}) e hiperpolarizar las células musculares lisas vasculares. En las arterias pulmonares de lechón, ya se había observado previamente que el SNP aumentaba unas tres veces la concentración de GMPc, y su efecto vasodilatador se inhibía casi completamente con ODQ (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997). En

nuestros experimentos, observamos que el ODQ también produjo una marcada inhibición de la respuesta vasodilatadora al NO, indicando que la GCs es el principal mecanismo responsable de los efectos vasodilatadores del NO en las arterias pulmonares de lechones recién nacidos. El GMPc produce vasodilatación por mecanismos tanto dependientes como independientes de la $[Ca^{2+}]_i$ que, en general, dependen de la activación de la PKG y la fosforilación de múltiples dianas que ésta produce. Los mecanismos independientes de la $[Ca^{2+}]_i$, que implican una reducción en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} no son bien conocidos. Se han descrito cambios en la actividad de la MLCK, pero también posiblemente está implicada la fosforilación de otras proteínas como la *heat shock related protein* de bajo peso molecular o incluso cambios en el acoplamiento de las proteínas contráctiles con el citoesqueleto celular (Woodrum y cols., 1999). Dentro de los mecanismos dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$, se han propuesto como dianas del GMPc múltiples mecanismos directa o indirectamente relacionados con la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ (Cogolludo, 1999). En arterias pulmonares de lechón se había observado previamente que la vasodilatación inducida por SNP se inhibía marcadamente por taspigargina, mientras que otros mecanismos, incluyendo el bloqueo de canales de K^+ , de Ca^{2+} o de la ATPasa Na^+/K^+ , no parecen jugar ningún papel (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997; Cogolludo y cols. 2001). Creemos que en nuestras condiciones experimentales, la vasodilatación producida por el NO en las arterias pulmonares de lechón, implica la estimulación de la GCs, el aumento del GMPc, la activación de la SERCA y una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$.

Papel de las fosfodiesterasas. El efecto del NO es transitorio y después de producir una relajación máxima, de forma espontánea se recupera la tensión inducida por el U46619. La desaparición del efecto del NO puede ser atribuida, en parte, a la disminución de la concentración de NO en el medio de incubación. Sin embargo, cuando se registra de forma simultánea la concentración de NO y la tensión se puede observar que cuando la concentración

de NO ha regresado a sus niveles basales, la fuerza contráctil aún no se ha recuperado completamente. Este retraso en la recuperación de la fuerza contráctil con respecto a la concentración de NO puede ser debido a que persiste un aumento en los niveles intracelulares de GMPc. Los nucleótidos cíclicos se degradan por fosfodiesterasas. La PDE-V es específica para el GMPc y se expresa de forma importante a nivel vascular pulmonar. Por ello, realizamos experimentos en presencia de dipiridamol, y en contra de lo que habíamos obtenido previamente con el SNP (Pérez-Vizcaíno y cols., 1997), el análisis de la curva concentración-respuesta demostró que el dipiridamol no potenciaba de forma significativa la respuesta vasodilatadora. Sin embargo, un análisis más detallado indicaba que el dipiridamol prolongaba el efecto vasodilatador del NO. Estos datos, junto con los obtenidos previamente con SNP, sugieren que la duración, pero no la magnitud, del efecto del NO depende de la capacidad metabólica de las células para degradar al GMPc generado. Sin embargo, si las concentraciones de NO se mantienen de forma más prolongada, p. ej., empleando un donador de NO, se aumenta no sólo la duración, sino también la magnitud del efecto vasodilatador del NO.

Papel del estrés oxidativo. La vasodilatación dependiente del endotelio está modulada por el balance de la concentración de NO y del O_2^- . El NO reacciona con el O_2^- y forma $ONOO^-$, que depende del NO e inhibe sus efectos vasodilatadores (Thannickal y Fanburg, 2000). Además, se ha descrito que algunos modelos de hipertensión pulmonar (Steinhorn y cols., 2001) están asociados a un aumento de las ERO. Por esta razón decidimos estudiar en nuestras condiciones experimentales el efecto del estrés oxidativo sobre la respuesta al NO en arterias pulmonares de lechón. Para ello, hemos utilizado diversas herramientas farmacológicas que sabemos que modifican el *status* del estrés oxidativo: SOD (transforma el O_2^- en H_2O_2), $MnCl_2$ y $MnTMPyP$ (miméticos de la SOD), complejo XO/HX (sistema generador de superóxido) y DETCA (inhibidor de la SOD) (Wang y cols., 1998). En las arterias pulmonares, tanto de animales de 1 día como de los de 2 semanas de edad, observamos que la disminución en la concentración del O_2^- tras la adición de

SOD o MnCl_2 potenciaba el efecto del NO. Por el contrario, el aumento en los niveles del O_2^- inducido tras la adición del sistema XO/HX o de DETCA reducía el efecto vasodilatador del NO. Con respecto a la concentración de NO detectada por el electrodo se observó que el sistema XO/HX disminuyó la concentración de NO en el medio, mientras que el DETCA, el MnCl_2 y la SOD no modificaron dicha concentración. Como comentamos anteriormente, el electrodo detecta aquello que ocurre en el baño y que, en principio, es ajeno al tejido. La reducción del efecto relajante y de la concentración de NO producida por el sistema XO/HX indica que el O_2^- generado inactiva rápidamente al NO durante el proceso de difusión en el baño de órganos, inhibiendo de esta forma su acción sobre el músculo liso vascular. El hecho de que el DETCA redujera la relajación inducida por NO sin modificar la concentración del NO detectado por el electrodo, indica que el incremento en los niveles del O_2^- tras la inhibición de la SOD queda restringido solo al tejido. La administración de la SOD o del MnCl_2 incrementó el efecto vasodilatador del NO pero sin modificar la concentración del NO detectado. Estos resultados indicarían que en nuestras condiciones experimentales se estaría produciendo el O_2^- en el tejido a una concentración suficiente para inactivar el NO agregado exógenamente y que el catabolismo del O_2^- se encuentra potenciado cuando se administra el mimético permeable de la SOD. El hecho de que la SOD, que no atraviesa la membrana, administrada exógenamente potencie el efecto relajante del NO indicaría que parte del O_2^- endógeno (el cual inactiva al NO) podría ser extracelular. Sin embargo, la inactivación del NO dependiente del O_2^- endógeno estaría restringida al área perivascular y, por lo tanto, la protección del NO por la SOD no sería detectable por el electrodo. Por todo lo anterior, podemos proponer que el efecto vasodilatador del NO está modulado por el nivel del O_2^- generado endógenamente por las arterias pulmonares. A su vez, la concentración del O_2^- a nivel tisular puede modularse farmacológicamente, tanto en sentido de aumento como de disminución, modificando, por tanto, la respuesta al NO. La difusión del O_2^- no está restringida a la célula concreta que lo ha producido, sino que probablemente afecta también a las

células adyacentes. Sin embargo, la producción y difusión del O_2^- endógeno no es suficiente para afectar a la concentración de NO en el baño de órganos.

Fuente del O_2^- en el tejido. Los principales sistemas enzimáticos generadores del O_2^- son: la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico (Thannickal y Fanburg, 2000). Para estudiar la influencia de estos sistemas enzimáticos se han utilizado el DPI, el L-NAME, la indometacina, el AA861, el SKF 525A, el oxipurinol y la rotenona (que inhiben la NAD(P)H oxidasa, la NOS, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico respectivamente) (Wang y cols., 1998; Fanburg y Thannickal, 2000). Para determinar el o los sistemas enzimáticos que intervienen en la producción del O_2^- capaz de inactivar el NO en las arterias pulmonares de lechón, realizamos las curvas concentración-respuesta al NO en presencia de estos inhibidores enzimáticos. Tanto en arterias de animales de 1 día como de 2 semanas de edad, el DPI potenciaba la relajación inducida por el NO. El DPI también puede inhibir el complejo I de la cadena respiratoria, pero el hecho de que el inhibidor más específico de este complejo, la rotenona, no modificara la respuesta al NO sugiere que la potenciación de la respuesta producida por el DPI es debido a su efecto inhibitor sobre la NAD(P)H oxidasa. Por tanto, la NAD(P)H oxidasa de la membrana es una fuente importante de producción del O_2^- en arterias pulmonares de lechón, tal y como se ha descrito en otros vasos (Wang y cols., 1998). Por el contrario, el L-NAME, el AA861, el SKF 525A, el oxipurinol y la rotenona no modificaron de manera significativa el efecto vasodilatador del NO, lo que sugiere que la NOS, la lipoxigenasa, la citocromo P450 oxidasa, la xantina oxidasa y la cadena mitocondrial de transporte electrónico no contribuyeron de manera importante a la inactivación del NO. En arterias pulmonares de animales de un día, pero no de 2 semanas de edad, la indometacina potenció el efecto vasodilatador del NO, lo que sugiere que la COX podría ser también una fuente del O_2^- que inactiva al NO. Como posibilidad alternativa, otros metabolitos

de la COX podrían de alguna manera inhibir el efecto vasodilatador del NO. En el momento actual, nuestros resultados no nos permiten distinguir entre ambas posibilidades. Dado que observamos una potenciación del efecto vasodilatador del NO con la aspirina, que a la concentración de $5 \times 10^{-5} \text{M}$ es un inhibidor relativamente selectivo de la COX-1 inhibidores mientras que con el inhibidor de la COX-2 NS398 no observaron cambios significativos, la isoforma responsable parece ser la COX-1.

Como hemos mencionado anteriormente, nuestros resultados indican que la NAD(P)H oxidasa de la membrana es una fuente importante de generación del O_2^- a nivel del tejido vascular pulmonar. Por esta razón decidimos realizar experimentos que nos condujeran a la localización de la NAD(P)H oxidasa en el tejido. Se ha descrito que en aorta de rata (Wuang y cols., 1998) y en arteria pulmonar de conejo (Steinhorn y cols., 1994), se localiza principalmente en la adventicia. Para determinar si la localización de la fuente del O_2^- en nuestras preparaciones era también la adventicia diseñamos una serie de experimentos en anillos arteriales invertidos, es decir, con la adventicia orientada hacia adentro. Como controles para este procedimiento de inversión en estos experimentos se utilizaron anillos doblemente invertidos, es decir, con la misma orientación que los anillos intactos. En arterias con la adventicia orientada hacia adentro (anillos invertidos), el efecto vasodilatador del NO fue mayor que el inducido en los anillos intactos y que en los anillos doblemente invertidos. Estos resultados sugieren que la principal fuente del O_2^- está localizada en la adventicia y que ésta actuaría como una *barrera química* para el NO. Es decir, que en anillos arteriales normales, el NO administrado exógenamente debe cruzar la adventicia para llegar a la célula muscular lisa y durante este trayecto podría ser inactivado, disminuyendo, su efecto vasodilatador.

Cuando los anillos invertidos fueron tratados con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI, el efecto relajante del NO fue similar al observado en ausencia de DPI. Estos resultados apoyan que el efecto de la inversión del anillo arterial, es debido a una menor inactivación del NO y que la localización principal de la NAD(P)H oxidasa está en la adventicia. Resultados simi-

lares han sido descritos por Steinhorn y cols. (1994). De hecho, Wuang y cols. (1998) han demostrado que las proteínas gp19phox, p22phox, p47phox y p67phox, subunidades de la NAD(P)H oxidasa, están exclusivamente localizadas en la capa adventicia de la aorta de rata.

Cambios con la edad postnatal. En apartados precedentes hemos considerado las características de la vasodilatación inducida por el NO, comentando brevemente las diferencias observadas entre los animales de 1 día y de 2 semanas de edad. Por ello, en este apartado, trataremos de analizar estas diferencias.

Los cambios en la vía NO/GMPc durante el periodo perinatal se han correlacionado con la progresiva disminución de las RVP que tiene lugar en el momento del nacimiento y durante los primeros días de vida. Así, cuando el feto ha estado expuesto a inhibidores de la NOS durante los últimos días *in utero*, la caída de resistencias vasculares está marcadamente reducida y sufre HPPN (Fineman y cols., 1995). En arterias pulmonares, la relajación endotelio-dependiente inducida por ACh, aumenta con la edad postnatal en conejos, corderos y cerdos (Liu y cols., 1992). Nuestros resultados con ACh confirman estos hallazgos, puesto que las preparaciones de animales de 2 semanas presentaron un efecto relajante mayor que el observado en las arterias procedentes de animales de un día de edad. Estas diferencias se han atribuido principalmente a cambios a nivel endotelial y, en particular, a la expresión de la eNOS. Uno de los argumentos para excluir posibles alteraciones a nivel de las CMLV ha sido la ausencia de cambios con la edad en la respuesta al SNP (Liu y cols., 1992). En nuestros experimentos con arterias pulmonares observamos un claro paralelismo entre la respuesta vasodilatadora a ACh y a NO exógeno (figura 13A y 14A), lo que sugiere que las diferencias no están relacionadas con cambios a nivel endotelial. Sin embargo, el efecto relajante producido por el 8-bromo-GMPc, un análogo del GMPc, no se modificó con la edad, indicando que los cambios con la edad no parecen estar relacionados con alteraciones en la señal de transducción más allá de la síntesis de GMPc.

En base a la evolución en la respuesta a ACh, NO y 8-bromo-GMPc, pensamos que las diferencias podrían ser atribuibles a cambios en el estado oxidativo, tal y como había sido descrito en conejos por Morecroft y cols. (1998). Sin embargo, en nuestros experimentos no observamos cambios en el efecto potenciador de la SOD, ni alteraciones en la respuesta a otros agentes que modulan el estado oxidativo, tales como el $MnCl_2$, el DETCA o la XO/HX. Más aún, tampoco observamos cambios en la respuesta a DPI, oxipurinol, rotenona y L-NAME o tras la inversión de las arterias pulmonares. Sin embargo, en presencia de indometacina, meclofenamato y aspirina las curvas concentración-respuesta a NO de preparaciones de animales de 1 día de edad se desplazaron hacia la izquierda, desapareciendo las diferencias en la respuesta a NO entre las preparaciones de animales 1 día o de 2 semanas de edad; este resultado sugiere que estas diferencias podrían ser secundarias a cambios en la actividad de la COX-1. Como se apuntó anteriormente, el mecanismo por el que un aumento de la actividad de la COX inhibe la respuesta al NO es desconocido. Sin embargo, podríamos especular que en las arterias pulmonares de animales de 1 día de edad otra fuente de producción del O_2^- (diferente a la NAD(P)H oxidasa) sería la COX-1. También estos resultados indicarían que la menor potencia del NO en arterias pulmonares procedentes de animales de 1 día con respecto a la de las 2 semanas de edad, estaría relacionada con el estrés oxidativo inducido por la COX-1.

NO versus donadores de NO.

Mecanismo de acción Dado que los donadores de NO necesitan liberar el NO para inducir su efecto vasodilatador, es de esperar que una vez liberado éste, el mecanismo de vasodilatación sea similar al del NO. Sin embargo, en la aorta de rata, se ha observado que el efecto del NO y de los donadores de NO puede presentar distinta susceptibilidad a su inhibición por el ODQ. Aunque en general se suele asumir que el SNAP y el SNP ejercen sus efectos vasodilatadores a través de la liberación de NO, es importante tener

en cuenta que el SNAP y el SNP pueden producir una respuesta vasodilatadora independiente de la liberación de NO. Así, se ha descrito que los nitrosioles (como el SNAP) activan directamente la GCs (Tseng y cols., 2000), mientras que el SNP, además libera cianuro, el cual ejerce efectos múltiples, incluyendo la activación de la GCs. Es posible que estos efectos pudieran contribuir a explicar el efecto diferencial de ODQ descrito por Tseng y sus colaboradores (2000). Sin embargo, en nuestras preparaciones observamos que los efectos inhibitorios tanto de ODQ como de tapsigargina sobre la vasodilatación inducida por el NO y los donadores de NO eran muy similares, lo que indica que el mecanismo de acción es común y sugiere que los efectos de los donadores de NO están exclusivamente mediados por la liberación de NO. En su conjunto, todos estos datos nos indican que el NO, el SNAP y el SNP, ejercen su efecto vasodilatador exactamente por el mismo mecanismo de acción y, por tanto, las diferencias que puedan encontrarse en cuanto a la modulación de sus efectos deberán estar relacionadas con las características de la liberación del NO (mecanismos o localización).

Cinética, potencia y duración de los efectos. La cinética y la potencia de los efectos vasodilatadores del NO gaseoso, del SNAP y del SNP resultaron ser muy distintas. El NO produjo un rápido efecto vasodilatador, mientras que el SNAP y, particularmente, el SNP, produjeron respuestas vasodilatadoras más lentas. Estos resultados sugerían que la velocidad a la que se alcanzaban las concentraciones efectivas de NO a nivel de la GCs fuese más rápida para el NO gaseoso, que sólo depende de la velocidad de difusión del gas en el medio. Sin embargo, el SNAP y el SNP exhibieron una cinética de liberación de NO intermedia y lenta respectivamente. En línea con estos hallazgos, la potencia del NO fue mayor que la del SNAP y ésta, a su vez, fue mayor que la del SNP, lo que también es un reflejo de la cinética más rápida de liberación de NO. Sin embargo, la duración de los efectos estaba inversamente relacionada con la velocidad de liberación de NO. Por tanto, a mayor velocidad de liberación de NO, más rápido aparecerá el efecto, mayor será la

potencia del fármaco pero también más rápido se consumirá y mas corta será la duración de los efectos.

Liberación de NO. Como se ha mencionado anteriormente, nuestros resultados demuestran que en las arterias pulmonares de animales de 2 semanas de edad, el efecto vasodilatador del NO es proporcional a la concentración de NO detectado por el electrodo. Con el SNAP el efecto relajante se presentó a partir de concentraciones bajas ($3 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-7}$ M), mientras que sólo cuando se administraron concentraciones altas ($3 \times 10^{-6} - 10^{-5}$ M) se pudo detectar un aumento en los niveles de NO en el baño con el electrodo. Estos resultados son congruentes con los descritos en plaquetas aisladas determinando los niveles de NO mediante la conversión de la oxihemoglobina en metahemoglobina. El SNP indujo un efecto vasodilatador dependiente de la concentración, pero no se detectaron cambios en los niveles de NO en el baño. Estos resultados indican que: a) el SNAP puede liberar NO al baño, aunque la mayor cantidad de NO se libera dentro del tejido donde induciría la respuesta vasodilatadora, mientras que la liberación de NO por el SNP ocurre solo en el tejido y no en el baño. b) el SNP no libera NO de forma espontánea sino tras activación metabólica, tal y como ha sido descrito anteriormente en otros tejidos vasculares.

Efecto de la oxihemoglobina. Nuestros resultados, también demuestran que la oxihemoglobina no modificó el efecto relajante del SNP y que inhibió ligeramente el efecto del SNAP, mientras que inhibió casi completamente el efecto vasodilatador del NO exógeno. Puesto que el NO reacciona con la oxihemoglobina de forma irreversible y con una estequiometría 1:1, cuando las concentraciones de NO se aproximan a las de oxihemoglobina, la inhibición desaparece. La oxihemoglobina es una proteína que al añadirla al baño permanece en el compartimento extracelular y sólo interacciona con el NO a nivel extracelular. Por tanto, estos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos con la detección electroquímica del NO y confirman la idea

que sugiere que el SNP libera el NO a nivel intracelular y que en el caso del SNAP, parte del NO es liberado en el medio extracelular aunque la mayoría se libera preferentemente a nivel intracelular.

Estrés oxidativo. Los resultados discutidos anteriormente indican que en las arterias pulmonares de lechón, la NAD(P)H oxidasa de la adventicia genera el O_2^- capaz de inactivar el NO. Por tanto, el NO exógeno puede inducir relajación de las células musculares lisas, siempre y cuando logre rebasar la *barrera química* de la adventicia. Con la utilización de fármacos que liberan NO a nivel intracelular se podría evitar la barrera de la adventicia y asegurar su efecto vasodilatador. A diferencia de los resultados obtenidos con el NO, el efecto relajante del SNAP no se modificó por la SOD exógena, el $MnCl_2$ o por el sistema generador del O_2^- XO/HX y sólo fue inhibido, débilmente, por el DETCA. Sin embargo, ninguno de estos agentes modificó la relajación inducida por el SNP. Es decir, el efecto relajante inducido por los donadores de NO se ve afectado levemente o no se afecta por el O_2^- endógeno, incluso cuando éste se incrementa al inhibir la SOD o al ser añadido exógenamente. De nuevo, estos datos concuerdan con los obtenidos con el electrodo y con la oxihemoglobina.

Tomando en su conjunto todos los resultados del presente trabajo, proponemos que el estrés oxidativo modula de forma distinta la acción vasodilatadora del NO gaseoso, del SNAP y del SNP y que estos donadores liberan NO a un compartimento diferente a la fuente endógena de producción del O_2^- (es decir, la adventicia). Dicho compartimento de liberación de NO estaría localizado en o cerca del sitio de acción del NO y, por tanto, no es fácilmente accesible al O_2^- endógeno (por ejemplo la célula muscular lisa).

IMPLICACIONES

Desde el punto de vista anatómico, la barrera adventicial no tiene una clara significación fisiológica para el NO, puesto que el endotelio es la prin-

principal fuente fisiológica de NO endógeno y desde donde éste difunde hacia las células musculares lisas adyacentes. Sin embargo, el NOi empleado en terapéutica tiene que cruzar la adventicia en su camino desde el alvéolo hacia las células musculares lisas de la arteria pulmonar. Por lo tanto, aun cuando la adventicia es una capa muy delgada en arterias de resistencia pulmonar, el NOi podría ser inactivado por el estrés oxidativo a este nivel.

En condiciones fisiológicas, la inactivación del NO por el O_2^- y la correspondiente producción de $ONOO^-$ esta limitada por la actividad de la SOD intracelular. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de NO (por ejemplo, tras la administración de NOi) o en situaciones patológicas (por ejemplo, hipertensión pulmonar asociada a sepsis, síndrome de distrés respiratorio, o de otras formas de daño pulmonar) puede producirse un aumento del estrés oxidativo y, en consecuencia, una elevación de los niveles de $ONOO^-$. Éste es un producto tóxico a nivel pulmonar (Hampl y Herget, 2000), por lo que el efecto beneficioso del NOi podría verse atenuado parcialmente por el daño pulmonar inducido por el $ONOO^-$. Por lo anterior, es importante que se evite en la medida de lo posible la formación de $ONOO^-$ durante la terapia del NOi.

El uso de donadores de NO administrados de forma inhalada, que son menos susceptibles a la inactivación por el O_2^- , podría ser una estrategia más efectiva para liberar NO en las CMLV, evitando la inactivación por el O_2^- y la formación excesiva de $ONOO^-$. De hecho, resultados preliminares indican que la administración de SOD por vía intravenosa asociada a la terapia con NOi puede ser beneficiosa (Albert y cols., 1999). Una teórica ventaja adicional es que la baja inactivación de los donadores de NO por la oxihemoglobina conllevaría un menor riesgo de metahemoglobinemia. Sin embargo, puesto que la inactivación del NO por oxihemoglobina determina la selectividad pulmonar (debido a la rápida eliminación del NO por la sangre), este beneficio podría conseguirse a costa de un incremento de sus efectos sistémicos (Green y cols., 1982). Recientemente, se han descrito estudios experimentales y clínicos acerca de la utilización de los donadores de NO administrados

por vía inhalatoria, principalmente con SNP que sugieren que estos fármacos podrían producir un efecto selectivo al nivel pulmonar.

VI. CONCLUSIONES

1. En las arterias pulmonares de lechones de 1 y 15 días de edad, el estrés oxidativo basal o el estimulado exógenamente, modula la acción vasodilatadora del NO. Nuestros resultados demuestran que la NAD(P)H oxidasa de la adventicia es la principal fuente endógena del anión superóxido.
2. La vasodilatación inducida por el NO de origen endotelial y por el NO exógeno aumenta con la edad postnatal. La actividad de la NAD(P)H oxidasa y de la PDE-V modula la respuesta al NO de manera similar en ambas edades. Sin embargo, este aumento de la respuesta al NO desaparece en presencia de indometacina, meclofenamato y aspirina, sugiriendo la implicación de un aumento en la actividad de la ciclooxigenasa-1 en los primeros momentos de vida postnatal.
3. El NO y los donadores de NO, SNAP y SNP, comparten el mismo mecanismo de acción vasodilatadora, pero presentan diferencias en la cinética y distribución regional de la liberación del NO, que influyen de manera importante no sólo en la potencia y duración del efecto relajante, sino también en la susceptibilidad para que este efecto sea inhibido por el anión superóxido y por la oxihemoglobina.
4. Salvando las limitaciones que todo estudio *in vitro* presenta, el hallazgo de que el SNAP y el SNP sufren una menor inactivación

por el anión superóxido que la que se observa con el NO gaseoso, sugiere que la administración de estos fármacos por vía inhalatoria, o la asociación de NOi con superóxido dismutasa o sus miméticos, podrían ser estrategias terapéuticas alternativas en la hipertensión pulmonar persistente neonatal para producir vasodilatación pulmonar menos dependientes del *status* oxidativo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABMAN S., CHATFIELD B., HALL S. Y MCMURTRY I. (1990) *Am. J. Physiol.* 259: H1921-H1927.
- (2) ABMAN S., CHATFIELD B., RODMAN D., HALL S. Y MCMURTRY I. (1991) *Am. J. Physiol.* 260: L280-L285.
- (3) ALBERT G., DAVIS J., ROBBINS C. Y STEINHORN R. (1999) *Pediatr. Res.* 45: 293A.
- (4) AZUMI H., INOUE N., TAKESHITA S., RIKITAKE Y., KAWASHIMA S., HAYASHI Y., ITOH H. Y YOKOYAMA M. (1999) *Circulation* 100:1494-1498.
- (5) COGOLLUDO A. (1999) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- (6) COGOLLUDO A., PÉREZ-VIZCAÍNO F., ZARAGOZÁ-ARNÁEZ F., IBARRA M., LÓPEZ-LÓPEZ G., LÓPEZ-MIRANDA V. Y TAMARGO J. (2001) *Br. J. Pharmacol.* 132: 959-967.
- (7) FINEMAN J., SOIFER S. Y HEYMANN M. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* 57: 115-134.
- (8) FINNER N. Y BARRINGTON K. The Cochrane Library. (2000) Oxford: Update Software. Issue 1.
- (9) FURCHGOTT R. *Mechanism of Vasodilatation.* (1988) Ed: Vanhoutte P., Raven Press, New York. 1988: 31-36.
- (10) FURCHGOTT R. Y ZAWADZKI J. (1980) *Nature* 288:373-376.
- (11) GERSONY W., DUC G. Y SINCLAIR J. (1969) *Circulation* 1969; 30: 87-94.
- (12) IGNARRO L., BUGA G., WOOD K., BYRNES R. Y CHAUDHURI G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9265-9269.

- (13) KARAKI H., OZAKI M., HORI M., MITSUI-SAITO K., AMANO K., HARADA, S. MIYAMOTO, H. NAKAZAWA K., WON K. Y SATO K. (1997) *Pharm. Rev.* 49:157-230.
- (14) LIU S., HISLOP A., HAWORTH S. Y BARNES P. (1992) *Br. J. Pharmacol.* 106: 324-330.
- (15) MORECROFT I. Y MCLEAN M. (1998) *Br. J. Pharmacol.* 125: 1585-1593.
- (16) MORIN F. Y STENMARK K. (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 151: 2010-2032.
- (17) PALMER R. Y MONCADA S. (1989) *Biochem. Biophys. Res.* 158: 348-352.
- (18) PÉREZ-VIZCAÍNO F., VILLAMOR E., DUARTE J. Y TAMARGO J. (1997) *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121: 1323-1333.
- (19) SÁNCHEZ-LUNA M., ELORZA M., ÁLVAREZ I., PÉREZ-RODRÍGUEZ J. Y QUERO J. (1993) En: *Physiologic Basis of Perinatal Care*. Eds: Medina J. y Quero J., Ergon. 395-398.
- (20) SIES H. (1999) *Oxidative stress and vascular disease*. Ed: Keaney J., Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-8.
- (21) STEINHORN R., RUSSEL J., LAKSHMINRUSIMHA S., GUGINO S., BLACK S. Y FINEMAN J. (2001) *Am J Physiol.* 280: H311-H317.
- (22) THANNICKAL V. Y FANBURG B. (2000) *Am. J. Physiol.* 279: L1005-L1028.
- (23) TOUYZ R. (2000) *Curr. Hypertens. Rep.* 2000; 2: 98-105.
- (24) TSENG CH., TABRIZI-FARD M. Y FUNG H. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 737-742.
- (25) WANG H., PAGANO J., DU Y., CAYATTE J., QUINN T., BRECHER P. Y COHEN A. (1998) *Circ Res.* 82: 810-818.
- (26) WOODRUM, D., BROPHY, C., WINGARD, C., BEALL, A. Y RASMUSSEN, H. (1999) *Am. J. Physiol.* 277: H931-H939.

Artículo Original

Biosensor para la determinación de glucosa provisto de una membrana de poliacrilamida con glucosa oxidasa *

SILVIA SERRADILLA RAZOLA, JEAN-MICHAEL KAUFFMANN*,
BEATRIZ LÓPEZ RUIZ

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid*

** Institute de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles. Campus
Plaine, CP 205/6, 1050 Brussels, Belgium*

RESUMEN

Se propone un nuevo diseño de biosensor amperométrico para la determinación de glucosa, utilizando glucosa oxidasa inmovilizada en membranas de poliacrilamida, obtenidas mediante la polimerización inducida por radiación gamma. El intervalo de linealidad obtenido fue $5,0 \times 10^{-5}$ M - $1,58 \times 10^{-4}$ M. Se estudió la interferencia producida por el ácido ascórbico. El biosensor propuesto se utilizó para determinar el contenido en glucosa de medios de cultivo celular y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por un método espectrofotométrico enzimático.

Palabras Clave: Biosensor, Glucosa oxidasa, Membrana de poliacrilamida

* Premio Carlos del Castillo Leyva de la Real Academia de Farmacia. Año 2001.

SUMMARY

Biosensor for glucose measurements based on glucose oxidase entrapment in polyacrylamide membrane.

An amperometric glucose biosensor was constructed using glucose oxidase immobilized into polyacrylamide membranes obtained by gamma radiation-induced polymerization. Calibration curves were lineal in the 5×10^{-5} M - 1.58×10^{-3} M range. The interference of ascorbic acid was studied. The biosensor was employed to analyze a glucose-containing cell culture media and the results were compared to those obtained by an enzymatic spectrophotometric method.

Key words: Biosensor, Glucose oxidase, polyacrylamide membrane.

INTRODUCCIÓN

Desde los años setenta se ha observado un gran incremento en el uso de preparaciones enzimáticas como reactivos analíticos, en sus dos versiones, solubles e inmovilizadas sobre una matriz inerte (1-2). La glucosa oxidasa es, sin duda, la enzima más utilizada como reactivo analítico debido, no solo a su eficacia en la determinación de glucosa, especie de gran interés analítico, sino también debido a su bajo precio y buena estabilidad, tanto soluble como inmovilizada. Todo ello hace del sistema glucosa/glucosa oxidasa un modelo muy conveniente, en particular en el campo de los biosensores (3).

Uno de los métodos más comunes de inmovilización enzimática utilizados en el diseño de electrodos enzimáticos o biosensores consiste en el atrapamiento del enzima en una matriz polimérica. El sistema de atrapamiento en geles poliméricos es tan poco agresivo como el de adsorción, es decir, las biomoléculas no se unen covalentemente a la matriz, lo que evita la pérdida de actividad enzimática, tan habitual en los procesos de inmovilización por uniones covalentes o enlaces cruzados. Los geles de poli(acrilamida) han sido (4) y siguen siendo (5-8) sistemas de inmovilización de biomoléculas muy adecuados para la fabricación de biosensores.

Generalmente, las reacciones de polimerización utilizan como agente iniciador persulfato de amonio y como catalizador de la reacción, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (9,10). Esta reacción resulta más eficaz que la polimerización con riboflavi-

na activada con radiación UV, pero requiere de un cuidadoso control de las condiciones de polimerización si se quieren obtener resultados fiables. El método de la riboflavina tiene la ventaja de que no se inicia hasta que la disolución del gel se expone a la radiación UV.

Es bien conocido el problema que aparece al utilizar gel de poli(acrilamida) como material inerte en la inmovilización enzimática. Se ha demostrado que, utilizando este procedimiento, la actividad enzimática desciende drásticamente, (alcanzando valores del 22% de la actividad en contraste con el 80-90% conseguido cuando el mismo enzima se inmoviliza en gelatina), esta caída de la actividad tan acusada es un "efecto secundario" del proceso de fotopolimerización clásico que requiere la preparación del gel, y que presenta el inconveniente de producir un exceso de radicales que dañan irreversiblemente al enzima.

Para evitar estos problemas, algunos autores han ensayado un procedimiento de inmovilización basado en la polimerización inducida por radiación gamma a baja temperatura de una disolución acuosa de la enzima mezclada con ésteres acrílicos y metacrílicos formadores de cristales (11-15). La principal característica de la matriz polimérica obtenida por este método es su estructura porosa que resulta de los microcristales de hielo dispersos en el monómero frío. La enzima se encuentra atrapada físicamente sobre las paredes de los poros. Con esta técnica de inmovilización, no es necesario el iniciador o disolvente orgánico para la polimerización. La ventaja de este método de atrapamiento se debe al hecho de que, al no haber enlaces covalentes entre la enzima y la matriz polimérica, se mantienen las propiedades nativas de la enzima.

Galiatsatos y col. (16) y Hajizadeh y col. (17) utilizaron radiación gamma para la obtención de polímeros destinados a la modificación de electrodos, estos autores han mostrado que la glucosa oxidasa y la lactato oxidasa pueden inmovilizarse en una matriz de poli (vinilalcohol) obteniendo una capa enzimática en sandwich entre dos capas de polímero. Doretto y col. (18) inmovilizaron colina oxidasa en membranas de poli (hidroxietilmetacrilato) obtenidas mediante polimerización inducida por radiación gamma a baja temperatura. Birch y col. (19) han utilizado la radiación γ de ^{60}Co para inmovilizar matrices de hidrogeles alrededor de la superficie de un electrodo de grafito.

En el presente trabajo se propone un nuevo electrodo amperométrico enzimático, específico para la determinación de glucosa, en el que la glucosa oxidasa se inmoviliza en un hidrogel de poliacrilamida con N,N'-metilenbisacrilamida como agente reticulante, y donde el proceso de polimerización se inicia con una radiación gamma. La radiación γ se utiliza como iniciadora y catalizadora de la reacción. Este método ofrece ventajas como, evitar la adición de reactivos al medio de reacción que pueden interferir con el enzima y no requerir el uso de temperaturas elevadas. Este último punto es de particular importancia cuando un enzima forma parte de la reacción. El electrodo enzimático se preparó colocando una fina capa de glucosa oxidasa inmovilizada alrededor de un electrodo de disco de platino.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

Las medidas amperométricas se llevaron a cabo en un potencios-tato Brucker, modelo E 230 conectado a un registrador Kipp & Zonen, modelo 111 BD Single Channel. Las voltamperometrías cíclicas se realizaron con un analizador voltamperométrico Bioanalytical System, Model CV-27. Los experimentos se efectuaron en una celda electroquímica de 10 mL compuesta por un electrodo de referencia de calomelanos saturado, un cable metálico de acero inoxidable como electrodo auxiliar y un electrodo de disco de platino como electrodo de trabajo. El transporte convectivo se consiguió mediante un agitador magnético.

Se utilizó una fuente de radiación γ de ^{60}Co con una intensidad de 0,03 Mrad/h (Université Libre de Bruxelles, Belgium).

Reactivos

La β -D-glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4.) de *Aspergillus niger* fue suministrada por Sigma. La glucosa, acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida fueron productos de Aldrich. El estireno sulfonato de sodio

fue preparado por El Du Pont de Nemours & Co. El ácido L-(+)-ascórbico se obtuvo de Acros Organic. El hidrogenofosfato de sodio anhidro y la sal sódica dihidratada del dihidrogenofosfato se obtuvieron de Vel S.A.

El agua desionizada, se obtuvo mediante el paso de agua bidestilada en vidrio Pirex, a través de un sistema de purificación de agua Milli-Q 50 de Millipore.

Inmovilización del enzima

Para preparar la disolución del gel se mezclaron disoluciones de acrilamida 5 M con N,N'-metilenbisacrilamida 5 M en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2, en una proporción 97:3 respectivamente. La disolución del gel con enzima se preparó disolviendo 2,5 mg de glucosa oxidasa en 1 mL de disolución del gel. En los casos indicados se añadió estiren sulfonato de sodio hasta una concentración final en el medio de reacción del 10 %. La mezcla se colocó entre dos láminas de vidrio separadas por un espaciador de plástico de 0,4 mm de espesor. Este sistema se introdujo en una fuente de ^{60}Co durante 1 hora, para iniciar la polimerización del gel. Cuando el estiren sulfonato de sodio está presente, el tiempo de radiación se prolongó hasta 3 horas. Al final de este período se obtuvo una película aún frágil, por lo que se dejó en reposo en una disolución tampón de fosfato durante 4 ó 5 días a 5°C para completar la polimerización. Al final de este tiempo la película se hizo resistente y manejable. Las membranas se cortaron en discos de 0,7 cm y se colocaron sobre la superficie del electrodo de platino, como se muestra en la Figura 1. Se utilizó este método para iniciar la reacción sin necesidad de añadir más especies que podrían dañar a la enzima inmovilizada y para evitar un incremento en la temperatura que podría alterarla. Como se observa en la Figura 2, con la radiación gamma se provoca una reacción radicalaria iniciada por los radicales hidroxilo originados de las moléculas de agua. El oxígeno disuelto inhibe el proceso de polimerización, por lo que las mezclas de gel deben ser fuertemente desoxigenadas, antes y durante el proceso de polimerización.

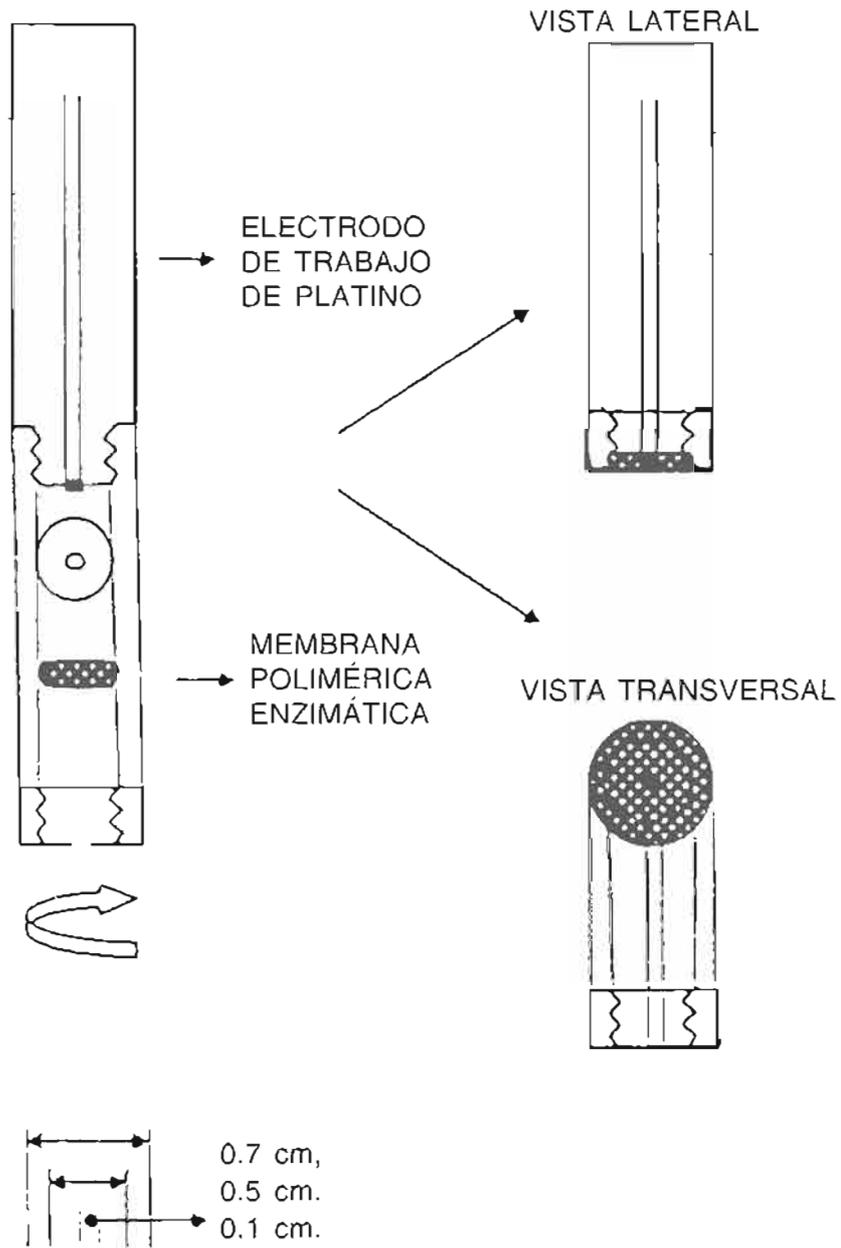


Figura 1. Electrodo de platino recubierto con la membrana polimérica

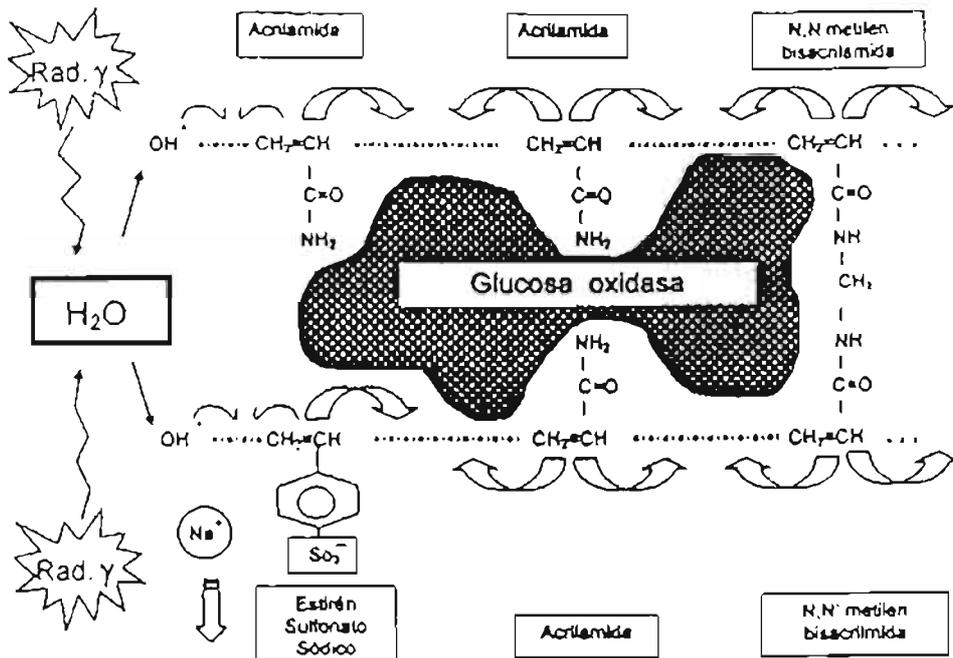


FIGURA 2. Reacción de polimerización con inmovilización de la glucosa oxidasa en la matriz polimérica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios preliminares

Se realizó un estudio amperométrico de H_2O_2 sobre el electrodo de platino, para un intervalo de concentración de $2,5 \times 10^{-5}$ M - $4,5 \times 10^{-4}$ M. En la primera experiencia el electrodo no se cubrió con ninguna membrana y posteriormente se cubrió, primero con una membrana de diálisis y luego con una película de gel de poliacrilamida. Los electrodos con membrana dieron una respuesta muy semejante entre ellos y significativamente menor a la obtenida con el electrodo sin membrana. Este efecto se debe a la restricción difusional producida por la membrana en la superficie del electrodo. En este medio el analito presenta un coeficiente de difusión mucho menor y como resultado genera una corriente más pequeña.

Influencia del grado de reticulación del gel

Se realizó este estudio para establecer el grado de reticulación óptimo que permitiera incluir e inmovilizar el mayor número de moléculas de glucosa oxidasa sin que se viera perjudicada la difusión de la glucosa a través del gel. En primer lugar se trató de averiguar la cantidad de N,N'-metilénbisacrilamida necesaria para una inmovilización eficaz del enzima. Para ello se prepararon tres películas de hidrogel con diferente porcentaje de agente reticulante (1%, 2% y 5%) respecto a la cantidad de monómero. Una vez preparadas se mantuvieron refrigeradas en una disolución tampón de fosfato durante dos semanas con el objetivo de que la enzima inmovilizada tuviera el tiempo suficiente para salir del gel. Las respuestas obtenidas por los hidrogeles con 2% y 5% de agente reticulante fueron similares. Sin embargo, la respuesta obtenida con el gel cuyo contenido en agente reticulante era 1% resultó ser inferior en un factor de 3. Este comportamiento podría explicarse como consecuencia de la difusión de la enzima hacia el exterior del gel en el proceso de hinchamiento del mismo en la disolución tampón. Los poros del hidrogel con 1% de agente reticulante eran demasiado grandes para mantener la glucosa oxidasa atrapada en su interior. Mientras que a partir de un 2% de agente reticulante de la enzima parece quedar retenida dentro de la red polimérica, por lo que no se consideró necesario aumentar este porcentaje en los siguientes experimentos, ya que no se mejoraba la retención del enzima y se podría dificultar la difusión del sustrato.

Influencia de la radiación gamma

Con el fin de conocer si la radiación gamma, utilizada como iniciador de la reacción de polimerización, podía dañar a la enzima, se utilizaron dos electrodos diferentes. En el primero, se depositó una disolución de enzima sobre la superficie de un gel y todo el conjunto se mantuvo en contacto con la superficie del electrodo, mientras que para preparar el segundo electrodo se preparó un gel con la misma cantidad de enzima, por el método propuesto, utilizando radiación gamma como iniciador de la reacción polimérica obteniéndose un gel del mismo grado de reticulación que el anterior. Las respuestas

obtenidas con ambos electrodos fueron similares, lo que permitió confirmar que la radiación gamma es inocua para la enzima.

Influencia del tiempo de radiación.

Para este estudio se prepararon tres geles irradiados durante 30 min, 5 y 11 horas respectivamente. Se ensayaron los tres tipos de membranas poliméricas con la enzima atrapada, registrando la señal obtenida con un electrodo de platino recubierto con dichos geles en función de la concentración de glucosa. Las respuestas obtenidas fueron idénticas en los tres casos, lo que demuestra que la actividad enzimática no se ve afectada por tiempos de irradiación de hasta 11 horas. El tiempo seleccionado para preparar las membranas poliméricas fue de 1 hora ya que tiempos inferiores daban lugar a geles de poca calidad física y tiempos superiores no ofrecían ninguna ventaja. Cuando el hidrogel contiene estirén sulfonato de sodio en su composición, fue necesario un tiempo de irradiación de dos horas debido al efecto de ralentización de la reacción polimérica que ejerce este reactivo.

Respuesta del electrodo al contenido de glucosa

Cuando se utilizó la membrana polimérica con la enzima atrapada se pudo observar una respuesta significativa a la glucosa (Fig. 3). Los parámetros experimentales obtenidos fueron: Intervalo de linealidad comprendido entre $5,0 \times 10^{-5}$ M y $1,58 \times 10^{-3}$ M, ecuación de la recta: $y = -0,697 + 33745,499 x$, con $r = 0,999$, límite de detección de $1,18 \times 10^{-6}$ M, concentración de glucosa correspondiente a la saturación enzimática $3,85 \times 10^{-3}$ M y $K_{m_{ap}} = 1,08 \times 10^{-3}$ M. La reacción global del biosensor fue rápida. Al ensayar cuatro electrodos preparados con discos de membrana polimérica tomados al azar del mismo gel las repuestas fueron muy similares, lo que demuestra la homogeneidad de dicho gel. Al realizar varias medidas consecutivas sobre la misma membrana se observa un ligero descenso en la respuesta, probablemente debido a la lenta difusión de los productos de la reacción enzimática que dificultan la entrada de la glucosa.

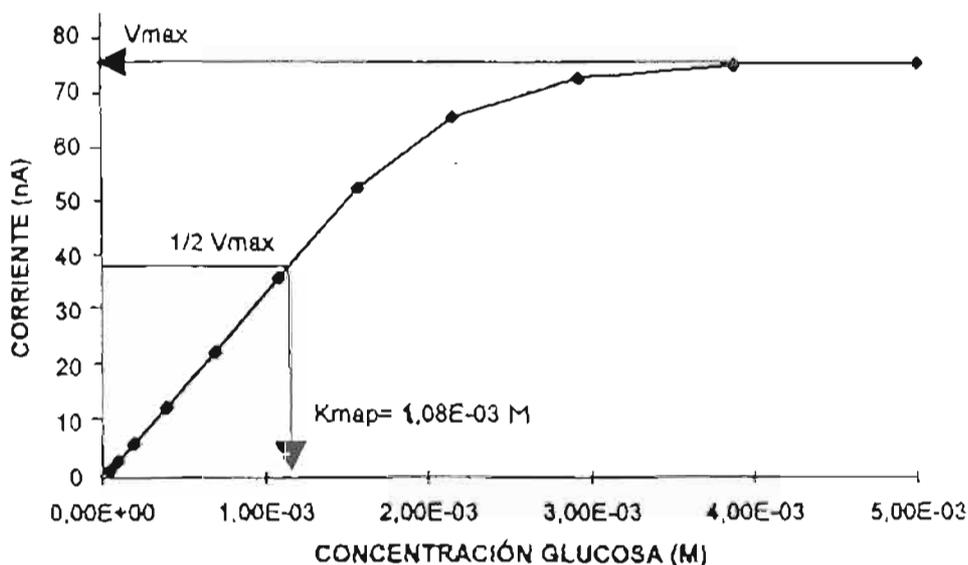


FIGURA 3. Cinética enzimática de la glucosa oxidasa inmovilizada físicamente en la membrana polimérica.

Interferencia causada por el ácido ascórbico

Teniendo en cuenta el objetivo de este biosensor y su posible aplicación como dispositivo para la determinación cuantitativa de glucosa en sistemas biológicos de matrices complejas, es necesario evitar las posibles interferencias causadas por sustancias que sufran oxidación al potencial aplicado (+ 0,7 V) en la determinación de la glucosa. El ácido ascórbico es la principal especie interferente. Si se consideran las constantes de disociación de esta molécula, $pK_1 = 4,17$ y $pK_2 = 11,57$, al pH fisiológico y al que habitualmente se realizan las medidas analíticas, el ácido ascórbico presentará una carga negativa. Una posible forma de eliminar la interferencia causada por la oxidación del ácido ascórbico al potencial de trabajo sería tratar de impedir su acercamiento a la superficie electrodo. Con este propósito se incorpora una carga negativa a la superficie de la membrana polimérica que provoque una repulsión electrostática entre esta especie y la membrana dificultando su acercamiento a la superficie electrodo y como consecuencia su oxidación, eliminán-

dose, así, la interferencia. Una forma de introducir esa carga negativa en la membrana consiste en añadir estireno sulfonato de sodio al medio de reacción (Fig. 2). Es necesario tener presente la cantidad diaria de vitamina C recomendada para la salud de los adultos, 45 mg. En el mejor de los casos, que la absorción de la vitamina C fuera del 100 % en sangre se encontrarían concentraciones de aproximadamente 5×10^{-5} M, es decir, muy inferiores a las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas en este estudio.

Con este propósito se estudió el comportamiento de la glucosa y del ácido ascórbico frente a dos membranas de distinta composición: (a) membrana enzimática de poliacrilamida y (b) membrana enzimática de poliacrilamida cargada negativamente con grupos sulfonato.

La Figura 4 muestra la señal del electrodo formado por la enzima atrapada en la membrana polimérica cargada negativamente, frente a disoluciones de glucosa patrón. Para el intervalo de concentraciones de glucosa comprendido entre $2,0 \times 10^{-4}$ M y $9,8 \times 10^{-4}$ M la corrien-

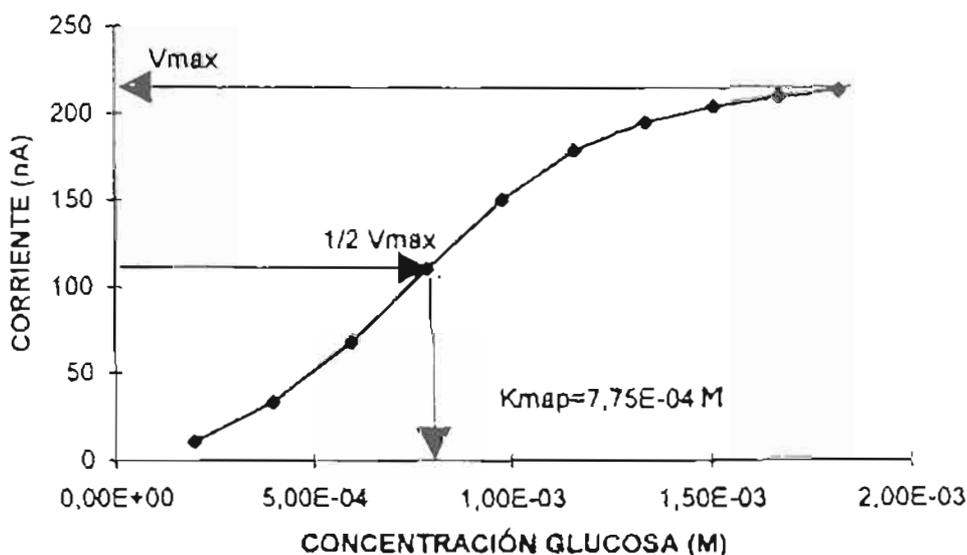


FIGURA 4. Cinética enzimática de la glucosa oxidasa inmovilizada físicamente en la membrana polimérica provista de grupos sulfonato

te aumenta linealmente con la concentración de sustrato. Para concentraciones superiores a $1,85 \times 10^{-3}$ M el valor de la corriente apenas se modifica. El límite de detección fue de $3,56 \times 10^{-6}$ M y el valor de $K_{m,ap}$ $7,75 \times 10^{-4}$ M. La respuesta del electrodo enzimático fue rápida. Al preparar distintos electrodos con membranas obtenidas al azar de un mismo gel, las repuestas obtenidas fueron totalmente aleatorias, lo que significa que la presencia de estiren sulfonato de sodio en el gel afecta enormemente a la reticulación dando como resultado geles muy heterogéneos.

La Figura 5 muestra el comportamiento del ácido ascórbico frente a electrodos de platino, sin membrana y con membranas de distinta composición. Primero se estudió el efecto del gel de poliacrilamida sin y con enzima y en ambos casos los resultados fueron semejantes pero significativamente menores a los obtenidos con el electrodo de platino sin membrana como era de esperar por la barrera difusional que crean las membranas poliméricas. Es importan-

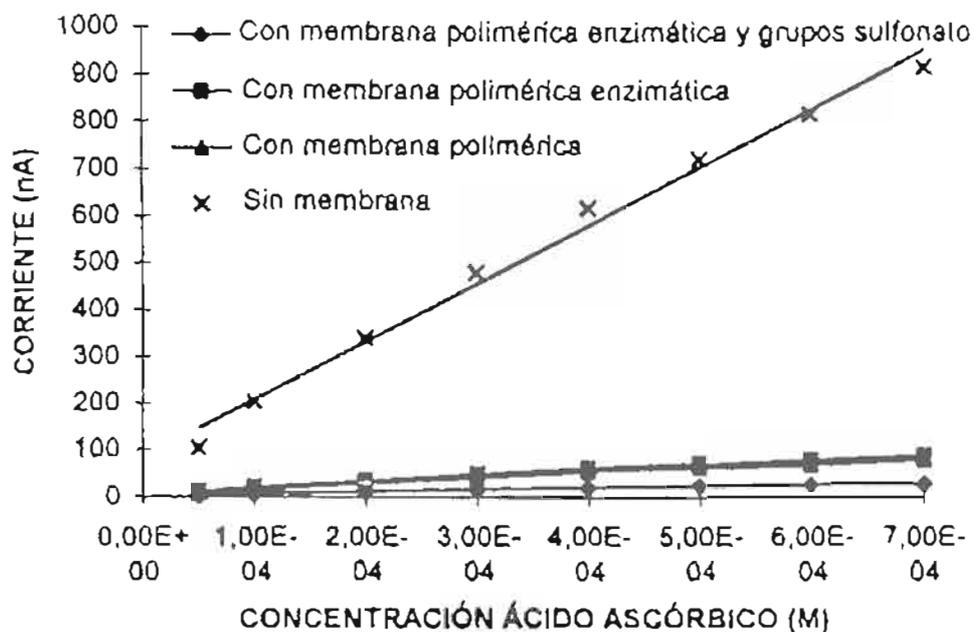


FIGURA 5. Curvas de calibrado del ácido ascórbico frente al electrodo de platino cubierto por distintas membranas.

te indicar que las membranas poliméricas enzimáticas generan señales ligeramente mayores que las generadas por las membranas poliméricas sin enzima. Este resultado se podría explicar como consecuencia del ensanchamiento efectivo que sufre el poro de la matriz polimérica, como si se tratara de un sistema elástico, hinchándose cuando una macromolécula como la enzima se introduce en él. Este mayor tamaño de poro traería como consecuencia una menor dificultad para atravesar la membrana. Al ser la membrana polimérica enzimática con grupos sulfonato la empleada, la señal obtenida fue tres veces menor, lo que prueba la repulsión ejercida por las cargas negativas. Bajo estas condiciones experimentales, la concentración de ácido ascórbico media encontrada en las muestras biológicas, alrededor de 1×10^{-5} M, no produciría un cambio significativo en la respuesta que se pudiera considerar como interferencia en las medidas de glucosa.

Determinación de glucosa en medios de cultivo

En la preparación de un medio de cultivo celular es importante reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones medioambientales de las células que van a crecer en él. El crecimiento celular puede caracterizarse en términos cuantitativos, hay varios factores que lo determinan, uno de ellos es la concentración de nutrientes, por su efecto directo sobre la velocidad de crecimiento celular. Por ello, la determinación del contenido en glucosa del medio de crecimiento ha adquirido una gran importancia. El biosensor propuesto en este estudio se ha utilizado para la cuantificación de glucosa en 16 muestras de 100 mL de medio de cultivo comercializado, las concentraciones de glucosa en las muestras estaban comprendidas entre 0 mM y 20 mM. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos. Como método de referencia se utilizó un método espectrofotométrico basado en las medidas de absorción de la quinoneimida generada en la reacción del H_2O_2 producido enzimáticamente con la glucosa en presencia de glucosa oxidasa y oxígeno, con 4-aminoantipirina y *p*-hidroxibenceno sulfonato, en presencia de peroxidasa a 505 nm.

TABLA I. *Concentración de glucosa de los medios de cultivo obtenida experimentalmente.*

NÚMERO DE MUESTRA	MÉTODO PROPUESTO ^a	MÉTODO DE REFERENCIA ^b
1	17 mM	21.08 mM
2	19 mM	20.45 mM
3	15 mM	17.67 mM
4	9.62 mM	11.10 mM
5	2.79 mM	3.81 mM
6	1.04 mM	1.13 mM
7	0.3 mM	0
8	0	0

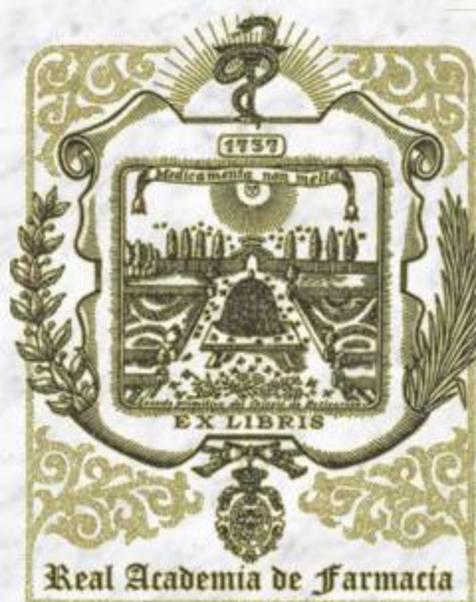
^a Biosensor con membrana polimérica enzimática que incluye grupos sulfonato

^b Método de referencia utilizado habitualmente en la cuantificación de la glucosa presente en los medios de cultivo celular

Al comparar los resultados obtenidos con el biosensor propuesto con los obtenidos mediante el método de referencia se puede observar que en todas las muestras los resultados obtenidos con el biosensor son aproximadamente un 15 % más bajos, probablemente debido al momento en el que se hizo el análisis, ya que las medidas obtenidas con el biosensor se realizaron tres días después de las medidas obtenidas con el método de referencia. Durante este período de tiempo las muestras se mantuvieron congeladas las primeras 48 horas para evitar el posible consumo de nutrientes por parte de las células, procediendo a su descongelación 24 horas antes del análisis. Este descenso en el contenido de glucosa podría haberse debido al consumo natural de nutrientes por las células.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MOTTOLA, H. A. (1987). *Analyst* 112: 719-727
- (2) RABA, J. y M. MOTTOLA, H. A. (1995). *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25: 1-42
- (3) MOTTOLA, H.A. (1983). *Anal. Chim. Acta* 145: 27-39.
- (4) GUILBAULT, G. G. y LUBRANO, G. J. (1973). *Anal. Chim. Acta* 64: 439-455.
- (5) GONZÁLEZ-SAIZ, J. M. y PIZARRO, C. (2001). *Eur. Polym. J.* 37: 495-444.
- (6) CARAS, S. D.; PETELEENZ, D. y JANATA, J. (1985). *Anal. Chem.* 57: 1920.
- (7) SHUL'GA, A. A.; SANDROVSKY, A. C.; STRIKHA, V. I.; SOLDATKIN, N. F.; STARODUB, N. F. y EL'SKAYA, V. (1992). *Sensors and Actuators B.* 10: 41.
- (8) JIMENEZ, C.; BARTROLI, J.; ROOIJ, N. F. y KOUDELKA-HEP, M. (1995). *Sensors and Actuators B* 26-27: 421-424.
- (9) BU, H-Z.; MIKKELSEN, S. R. y ENGLISH, A. M. (1995). *Anal. Chem.* 67: 4071-4076
- (10) BU, H-Z.; MIKKELSEN, S. R. y ENGLISH, A. M. (1998). *Anal. Chem.* 70: 4320-4325.
- (11) DORETTI, L.; FERRARA, D. y LORA, S. (1993). *Biosensor Bioelectron.* 8: 443
- (12) KAETSU, I.; KUMAKURA, M.; FUJIMURA, T.; YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KASAI, N. y TAMADA, M. (1986). *Radiat. Phys. Chem.* 27: 245
- (13) KAETSU, I. (1981). *Radiat. Phys. Chem.* 18: 3443
- (14) CARENZA, M., LORA, S., PALME, G., BOCCU, E., LARGAIOLLI, R. AND VERONESE, F.M. (1988). *Radiat. Phys. Chem.* 31: 657
- (15) GURSEL, I. y HARISCI, V.N. (1992). *Biomaterials* 13: 150
- (16) GALIATSATOS, C., IKARILAMA, Y., MARK, J.E. y HEINEMAN, W.R. (1990). *Biosensors Bioelectron.* 5: 47
- (17) HAJZADEH, K., HALSAIL, H.B. y HEINEMAN, W.R. (1991). *Anal. Chim. Acta* 243: 23
- (18) DORETTI, L.; GATTOLIN, P. y LORA, S. (1994). *Anal. Lett.* 27: 2455-2470
- (19) BIRCH, M. E.; COURY, L. A. y HEINEMAN, W. R. (1990). *Anal. Chem.* 62: 1123-1130



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com