

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2005

VOLUMEN LXXII

Núm. 1

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia
FARMACIA, 11 • 28004 MADRID

Los Premios Nobel 2004 en Fisiología o Medicina y en Química: La importancia de los olores y del «Beso de la muerte»

JUAN RAMÓN LACADENA CALERO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Como introducción a la sesión científica que esta Real Academia dedica a los Premios Nobel 2004 en Fisiología o Medicina, se hace un breve comentario al trabajo de los doctores Axel y Buck sobre los receptores olfativos y la organización del sistema olfativo dentro de un marco de referencia de la Genética del Comportamiento Humano de la percepción de los sentidos. El trabajo seminal de Axel y Buck de 1991 permitió caracterizar 18 miembros diferentes de una familia multi-génica que codifica para siete dominios proteicos transmembrana cuya expresión está restringida al epitelio olfativo. Posteriormente, ambos dedicaron sus esfuerzos en clarificar el sistema del olfato desde el nivel molecular al de organización topográfica celular.

En cuanto al Premio Nobel 2004 en Química, se glosa brevemente el trabajo de los doctores Ciechanover, Hershko y Rose, sobre la degradación de las proteínas mediatizada por ubiquitina. La degradación de las proteínas por los proteosomas responde a un proceso altamente regulado que comienza con su marcado molecular: el «beso de la muerte» de las ubiquitinas.

Palabras clave: Sistema olfativo.—Receptores olfativos.—Degradación proteínas.—Ubiquitinas.

ABSTRACT

As an introduction to the scientific session that the National Royal Academy of Pharmacy devotes to the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004, a brief

commentary is made about the investigations carried out by Drs. Axel and Buck on odorant receptors and the organization of the olfactory system. In their pivotal work of 1991, they described a very large multigene family for odorant receptors, characterizing 18 members that encode seven transmembrane domain proteins whose expression is restricted to the olfactory epithelium. Afterwards, working independently, they clarify the olfactory system, from the molecular level to the organization of the cells involved.

In regard to the Nobel Prize in Chemistry 2004, the investigations of Drs. Ciechanover, Hersko and Rose on the ubiquitin-mediated protein degradation is briefly commented. The protein degradation by the proteasomes is not indiscriminated but highly regulated. The controlled process begins when the protein is labelled by ubiquitin: it is the «kiss of death».

Key words: Olfactory system.—Odorant receptors.—Protein degradation.—Ubiquitin.

PRESENTACIÓN

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia celebra una sesión científica para tratar los Premios Nobel en Fisiología o Medicina y en Química que en este año 2004 han recaído, respectivamente, en el doctor Richard Axel y la doctora Linda B. Buck, «por sus descubrimientos de los receptores olfativos y la organización del sistema olfativo», y en los doctores Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose, «por el descubrimiento de la degradación de proteínas mediatizada por ubiquitina». Para hablarnos del contenido científico de las investigaciones que han dado lugar a estos premios contamos hoy con las intervenciones de las Excmas. Sras. Académicas Numerarias de esta Real Academia Nacional de Farmacia, doña María Teresa Miras Portugal y doña María Cascales Angosto. Antes de darles a ellas la palabra, permítaseme decir unas breves ideas sobre los premios en cuestión, especialmente sobre el de Fisiología o Medicina.

Cuando los medios de comunicación dieron a conocer que el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2004 tenía que ver con el sentido del olfato, inmediatamente vino a mi mente la novela «El perfume», de Patrick Süskind, escrita en 1985, que fue un gran éxito editorial en Alemania y traducida ese mismo año al español.

En las primeras páginas de su novela de género negro, Süskind nos relata el drama de un recién nacido llamado Jean-Baptiste Grenouille que, como no olía a nada, su horrorizada nodriza se negó a seguir criándole: «Si la cuestión tiene o no algo que ver con el demonio —le decía la nodriza al padre Terrier—, no es asunto de mi incumbencia. Yo sólo sé una cosa: que este niño me horroriza porque no huele como deben oler los lactantes». A partir de ahí, la trama apasionante de la novela se desarrolla en función de que aquel ser anómalo, que no olía a nada de recién nacido, sin embargo tenía enormemente desarrollado el sentido del olfato porque poseía una nariz privilegiada que le permitía identificar a gran distancia, incluso a través de las paredes, cualquier efluvio. Esta condición le convirtió en un individuo maldito, en un monstruo.

No cabe duda que el olor es importante porque es capaz de identificar muchas cosas. Ya lo dijo Shakespeare: «Una rosa, con otro nombre, tendría el mismo aroma». Por otro lado, al leer en «Hamlet», también del mismo Shakespeare, la expresión: «algo huele a podrido en Dinamarca», inmediatamente somos capaces de recordar el olor a podrido. ¿Por qué tenemos metidos los olores en el cerebro? Esa es la «lógica del olfato», utilizando la expresión que dijo en 2001 una de las personas galardonadas con este premio Nobel.

Como supongo que la profesora Miras abordará su intervención más desde el punto de vista neurobiológico, permítaseme que yo haga una breve disquisición desde el punto de vista de la Genética.

GENÉTICA DEL COMPORTAMIENTO

Dentro de la Biología en general y de la Genética en particular, no hay duda de que el desarrollo de los organismos es uno de los temas más fundamentales y fascinantes. De hecho, no hace muchos años, las investigaciones sobre el control genético del desarrollo les valió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina a Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Erick F. Wieschaus, «por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión» (1995), y a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston, «por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada» (2002).

En el proceso de desarrollo cabe distinguir los siguientes fenómenos o componentes del desarrollo: la replicación genética, la proliferación celular, la citodiferenciación, la histogénesis como resultado de la agregación de las células diferenciadas para constituir un tejido con función especializada, la organogénesis como consecuencia de la asociación de tejidos que da como resultado final la forma del individuo (morfogénesis) y, finalmente, el comportamiento como última expresión multidimensional del desarrollo. En términos genéticos analógicos podría decirse que en el proceso de desarrollo se pasa de la información genética unidimensional contenida en la secuencia lineal de bases nitrogenadas de la molécula de ADN, a las hojas blastodérmicas bidimensionales, que tras un proceso morfogenético se transforman en el individuo tridimensional que exhibirá unas pautas de comportamiento multidimensional a lo largo de su vida (Lacadena, 1988, 1999).

Desde el punto de vista genético, el comportamiento es, quizá, uno de los componentes del desarrollo más difíciles de analizar, pero no por eso fuera del alcance de un control genético. Siguiendo al profesor Pinillos (1969), una definición sencilla para algo que puede ser tan complejo es definir el comportamiento como «cualquier reacción a cualquier estímulo». Dentro de la escala evolutiva de los seres vivos, el comportamiento se manifiesta a distintos niveles, incluyendo desde los tropismos y taxias más simples a las formas más complejas que se encuentran en los vertebrados como son los reflejos, los instintos, el aprendizaje y la inteligencia en sus distintos grados.

La Genética del comportamiento estudia el control genético de las acciones de los organismos, entendiendo como acción cualquier respuesta a cualquier estímulo (Lacadena, 1988). Las dificultades que presenta el análisis genético del comportamiento provienen fundamentalmente de tres fuentes: 1) la ambigüedad con que se establece en ocasiones el propio concepto de comportamiento, de manera que mal podremos analizar genéticamente algo sin saber a ciencia cierta lo que pretendemos estudiar; 2) la distancia entre el fenotipo (la pauta de comportamiento) y el genotipo que lo determina, pues entre ambos media un complejo camino fisiológico que recorrer, ya que la acción genética primaria puede afectar a los órganos sensoriales (receptores), cambiando la información recibida; al sistema

intermediario nervioso o endocrino (conductores), alterando las capacidades de coordinación o percepción y a los órganos efectores musculares o glandulares, modificando la respuesta; 3) la influencia del ambiente en la manifestación del fenotipo que es la pauta de comportamiento: el fenotipo es la expresión del genotipo en un ambiente determinado, resultando difícil en muchos análisis genéticos del comportamiento discernir la importancia relativa de los componentes genético y ambiental.

Respecto a la metodología genética cabe decir que existen dos tipos de aproximaciones opuestas: partiendo de genotipos mutantes tratar de analizar las posibles variaciones del patrón de comportamiento (método genotípico) o bien, a partir de la variabilidad fenotípica de comportamiento observada, tratar de conocer su base genética (método fenotípico).

Los estudios genéticos del comportamiento humano se pueden sistematizar agrupándolos en cuatro apartados: la percepción de los sentidos (vista, oído, olfato, gusto y tacto), la estructura de la personalidad, la inteligencia y las anomalías de la razón (que pueden o no afectar a la capacidad intelectual). En lo que se refiere a la percepción de los sentidos, se han descrito desde hace mucho tiempo estudios genéticos sobre el daltonismo, la sordera, la sensibilidad para ciertos gustos, etc. Es obvio que en el presente contexto del Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2004, lo que nos interese sea el sentido del olfato.

El 4 de octubre de 2004, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska hacía pública la concesión del premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente al doctor Richard Axel y a la doctora Linda B. Buck, por sus descubrimientos de los «receptores olfativos (odorant) y la organización del sistema olfativo» («odorant receptors and the organization of the olfactory system»). Aquí debo manifestar mi dificultad de transcribir adecuadamente en español los términos ingleses «odorant» (oloroso) y «olfactory» (olfativo y olfatorio). Como se indica en la comunicación oficial del Instituto Karolinska a la prensa, el sentido del olfato humano ha sido el más enigmático de nuestros sentidos, de manera que durante largo tiempo fueron desconocidos los fundamentos científicos básicos por los que se reconocen y recuerdan los 10.000 olores diferentes estimados.

Cada célula receptora olfativa (olfactory) posee un solo tipo de receptor olfativo (odorant) y, a su vez, cada receptor puede detectar un número limitado de sustancias olorosas (odorant); es decir, cada una de nuestras células receptoras olfativas (olfactory) está altamente especializada para unos pocos olores.

Los estudios pioneros de Axel y Buck partieron de un trabajo conjunto que publicaron en 1991 en la revista *Cell*, en el que describían en ratas la clonación y caracterización de 18 miembros diferentes de una familia multigénica extremadamente grande (posiblemente, varios centenares de genes) que codifica para siete dominios proteicos transmembrana cuya expresión está restringida al epitelio olfativo, concluyendo que la familia de genes descubierta codifica para receptores olfativos.

La estrategia experimental diseñada por Axel y Buck para aislar los genes que codifican para receptores olfativos la basaron en los tres supuestos siguientes: 1) los receptores olfativos deberían de pertenecer a la superfamilia de receptores proteicos que transducen señales intracelulares por acoplamiento a proteínas que se unen a GTP; 2) el elevado número de moléculas químicas olorosas diferentes que existe sugiere que los propios receptores olfativos deberían mostrar una gran diversidad y, consecuentemente, estar codificados por una familia multigénica; 3) la expresión de los receptores olfativos debería estar restringida al epitelio olfativo.

La identificación en el epitelio olfativo de la superfamilia proteica con los siete dominios transmembrana se llevó a cabo por amplificación del ADN homólogo de los genes de la superfamilia génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ARN aislado de células del epitelio olfativo.

Con posterioridad a este trabajo pionero, Richard Axel y Linda B. Buck continuaron sus investigaciones de forma independiente aunque a veces por rutas paralelas. Gracias a sus estudios llegaron a clarificar el sistema del olfato desde el nivel molecular al de organización topográfica celular. Por ejemplo, las neuronas olfativas que expresan un determinado receptor olfativo se proyectan con precisión a 2 de los 1.800 glomérulos dentro del bulbo olfatorio para crear un mapa topográfico de calidad olorosa. Pues bien, Axel y colaboradores (Wang et al., 1998) demostraron que mutaciones por

delección o mutaciones sin sentido del gen que codifica para el receptor olfativo P2 determinan que los axones de estas células se dispersen en lugar de converger sobre un glomérulo específico. Asimismo, la sustitución del gen P2 por la región codificadora del gen P3 da lugar a que los axones P3 → P2 se proyecten hacia un glomérulo cercano al glomérulo tipo P3. Sus conclusiones señalaban que el receptor olfativo juega un papel instructivo en el establecimiento del mapa topográfico.

Uno de los más recientes trabajos publicados por Axel en la revista *Nature* en colaboración con el grupo de Jaenisch (4 de marzo de 2004) ha sido la obtención de ratones clónicos obtenidos a partir de la transferencia de núcleos procedentes de neuronas sensoriales olfativas a ovocitos enucleados, demostrando que el patrón de expresión y organización de los genes de receptores olfativos no varía en los ratones clónicos en relación con los ratones normales (Eggan et al., 2004). Por otra parte, podemos mencionar también el trabajo de Buck y colaboradores (Zou et al., 2001) quienes, utilizando ratones transgénicos obtenidos mediante la técnica de recombinación homóloga (gene targeting) en células troncales embrionarias, demostraron mediante experimentos de trazabilidad o seguimiento (tracing) genético la existencia de un mapa sensorial estereotipado en el cortex olfatorio del ratón. En cierta ocasión, Linda B. Buck dio una conferencia en el Instituto Karolinska durante el Nobel Symposia del 7 de diciembre de 2001 sobre la «lógica del olfato» («the logic of smell»), sin duda como premonición del galardón máximo que iba a recibir tres años después.

En este contexto de los olores y el olfato puede hacerse referencia también a las feromonas, moléculas que pueden influir en diferentes comportamientos sociales, especialmente en los animales, y cuyo papel evolutivo puede ser importante por cuanto afectan a la reproducción. Axel y Buck descubrieron, trabajando por separado, que las feromonas son detectadas por otras dos familias de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) localizados en una parte diferente del epitelio nasal.

Permítaseme recordar, en este contexto, la importancia de los olores. Cuentan de Napoleón Bonaparte que cuando, estando en campaña, decidía volver a la retaguardia escribía a la emperatriz Josefina anunciándole su visita con varios días de antelación y ro-

gándole que no se lavara durante ese tiempo. Algo similar sería el caso de los gitanos que les gusta el «olor de su hembra», citándose lo sucedido con aquel gitano que quería agredir a un médico de un hospital porque habían obligado a duchar a su mujer y le habían quitado el «olor a hembra».

EL «BESO DE LA MUERTE»: EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2004

El 6 de octubre de 2004, la Real Academia de Ciencias de Suecia decidió otorgar el Premio Nobel en Química 2004 conjuntamente a los doctores Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose, «por el descubrimiento de la degradación de proteínas mediatizada por ubiquitina». Como dice la comunicación oficial de la Academia y han recogido las propias revistas científicas (como *Nature*) y numerosos medios de comunicación, el argumento de las investigaciones premiadas es el «beso de la muerte», en alusión a la película de cine negro de 1947, «Kiss of death», del director Henry Hathaway. En 2002, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina premiaba las investigaciones sobre apoptosis o muerte celular programada, este año 2004 se ha premiado el control de la destrucción de las proteínas. Esperemos que estas investigaciones no supongan una visión pesimista de la vida.

Las investigaciones de los tres galardonados han permitido darnos cuenta de que la célula funciona como una estación de control (checking station) donde las proteínas son construidas y destruidas a un ritmo frenético. Como señala la nota de prensa de la Academia sueca, durante mucho tiempo el interés de la ciencia se fijaba más en la construcción que en la destrucción de las proteínas. Sin embargo, hoy se ha llegado a saber que la degradación de las proteínas no se produce de forma indiscriminada, sino que el proceso está altamente regulado de manera que las proteínas que han de ser destruidas sufren un etiquetado molecular —el «beso de la muerte»— y luego degradadas en los proteosomas. El etiquetado molecular consiste en la molécula llamada ubiquitina. Procesos celulares tan importantes como la división celular, la reparación del ADN, el control de calidad de las proteínas de nueva síntesis y los sistemas inmuno-

lógicos de defensa, por citar algunos de ellos, son ejemplos de procesos controlados por la degradación de proteínas mediatizada por ubiquitina.

Los trabajos seminales de Ciechanover y de Hershko fueron publicados en los Proceedings of the National Academy of Sciences de los Estados Unidos en 1980. Como ya ha ocurrido en otras ocasiones, la limitación a tres del número máximo de galardonados por cada premio Nobel ha dejado fuera al doctor Alexander Varshavsky, biólogo celular del California Institute of Technology en Pasadena, cuyo trabajo en levaduras sirvió para confirmar el papel de las ubiquitinas. Como señalaba un comentarista de la revista *Nature*, la posición de Varshavsky, más próxima a la biología celular que a la bioquímica, le ha alejado del premio Nobel de Química. Por el contrario, el doctor Irwin A. Rose estudió la química que subyace en el sendero de las ubiquitinas, poniendo las bases para las investigaciones realizadas en los años ochenta por Ciechanover y Hershko. El propio Hershko lamentaba lo ocurrido y decía que «la importancia de lo que hemos hecho solamente se aclaró después del trabajo de Varshavsky» (Giles, 2004).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BUCK, L.; AXEL, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175-187.
- (2) CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A. L.; HERSHKO, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 1365-1368.
- (3) EGGAN, K.; BALWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; CHESSE, A.; AXEL, R.; JAENISCH, R. (2004). Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 428: 44-49.
- (4) GILES, J. (2004). Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. *Nature*, 431: 729.
- (5) HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; HAAS, A. L.; ROSE, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 1783-1786.
- (6) LACADENA, J. R. (1988). Genética (4.^a edición), (Capítulo XXI: Genética del comportamiento), A.G.E.S.A., Madrid.
- (7) LACADENA, J. R. (1999). Genética General. Conceptos fundamentales. (Capítulo 16: Genética del desarrollo en eucariontes), Editorial Síntesis, Madrid.
- (8) PINILLOS, J. L. (1969). La mente humana. Biblioteca Básica Salvat de Libros RTV.

- (9) SÜSKIND, P. (1985). El perfume. Seix Barral, S. A., Barcelona.
- (10) WANG, F.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; AXEL, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*, 93: 47-60.
- (11) ZOU, Z.; HOROWITZ, L. S.; MONTMAYEUR, J.-P.; SNAPPER, S.; BUCK, L. B. (2001). Genetic tracing reveals the stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*, 414: 173-179.

Receptores olfativos: El perfume del éxito

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2004 ha sido concedido a los doctores Richard Axel, de la Universidad de Columbia en Nueva York, y Linda B. Buck, investigadora del Fred Hutchinson Cancer Research Center de la Universidad de Washington, en Seattle, ambos miembros del Howard Hughes Medical Institute. La doctora Linda B. Buck es la séptima mujer galardonada con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina. En el año 1991 ambos investigadores descubren la amplia familia de receptores olfativos y su pertenencia a los siete hélices transmembranares. Su trabajo pionero ha permitido identificar hasta mil genes en roedores y hoy día se conoce el número de genes olfativos en la mayoría de los mamíferos y otros animales de experimentación, además han demostrado que cada neurona olfativa expresa sólo un tipo de receptor. Posteriormente, con sus respectivos grupos y de modo independiente han establecido el modo en que los axones se organizan y siguen caminos prefijados para establecer las conexiones en los glomérulos específicos del bulbo olfativo, así como las bases para que un receptor olfativo reconozca una sustancia olorosa, los aspectos moleculares de su estructura y la relación con la captación del olor. Estas etapas son indispensables para diferenciar las características del aroma específico y permitir la formación y consolidación de la memoria olfativa.

Palabras clave: Receptores olfativos.—Epitelio olfativo.—Receptores siete hélices.—Memoria olfativa.—Vías olfativas.

ABSTRACT

The Nobel Prize in Physiology and Medicine of the year 2004, has been awarded to two neuroscientists, Dr. Richard Axel from Columbia University in New York

and Dr. Linda B. Buck from the Fred Hutchinson Cancer Research Center at the Washington University in Seattle, both are members of the Howard Hughes Medical Institute. It is to notice that Dr. Linda B. Buck is only the 7^a woman ever to win the Nobel Prize in Physiology and Medicine. In 1991 both scientists discovered the multigenic family of olfactory receptors, which belong to the seventh helix transmembrane receptors. Their work has allowed to identify about 1000 different olfactory receptors, in rat and mouse, as also in other animal species, on the other hand they have shown that each neuron expresses only one type of the olfactory receptor family. In separate work with their respective groups they showed how identical olfactory axons organise and follow a specific pathway to reach one single glomerulus in each olfactory bulb moiety. On the other hand they showed that any receptor can be activated by a group of similar scents, and also that a specific odour can activate several sensitive neurons. The researchers revealed that a combinatorial code is necessary to recognize more than 10000 different odours. All these steps are necessary to establish our memories, at the olfactory cortex.

Key words: Olfactory receptors.—Olfactory epithelium.—Seventh helix receptors.—Olfactory memory.—Olfactory tract.

INTRODUCCIÓN

Los galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2004 han sido el doctor Richard Axel, profesor de la Universidad de Columbia en Nueva York, y la doctora Linda B. Buck, investigadora del Fred Hutchinson Cancer Research Center de la Universidad de Washington, en Seattle, ambos son miembros del Howard Hughes Medical Institute. La doctora Linda B. Buck es la séptima mujer galardonada con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina. El galardón les ha sido concedido por sus descubrimientos en el campo de los receptores olfativos, desde los aspectos moleculares de su estructura y la relación con la captación del olor al modo como los axones se organizan y siguen caminos prefijados para establecer las conexiones en los glomérulos del bulbo olfativo. Estas etapas son indispensables para diferenciar las características del aroma específico y permitir la formación y consolidación de la memoria olfativa.

Gracias a sus hallazgos podemos explicar cómo un aroma determinado o un perfume específico nos lleva a evocar tiempos y situaciones pasadas de especial significado en nuestras vidas, recordemos

solamente el aroma de la magdalena en la taza de té que sirvió de excusa a Marcel Proust para ir *en busca del tiempo perdido*.

Antes de entrar definitivamente en la materia, permítaseme recordar una de las anécdotas referentes al doctor Axel y que aparece recogida en la información digital de la Universidad de Columbia. Al parecer, el doctor Axel era un excelente estudiante, pero volcado desde siempre en la investigación y el laboratorio. Cuando se examinó para obtener su título de médico, el comité de la Universidad le concedió el título con la condición de que nunca tocaría a un paciente, al menos mientras estuviera vivo (el paciente). Cierto o no, nos indica la gran perspicacia y carencia de dogmatismo de los miembros del comité y la temprana vocación del galardonado.

En los sistemas sensoriales de los vertebrados, las neuronas periféricas reciben información del entorno y la transmiten al cerebro donde es procesada para obtener una representación interna del mundo exterior. La mayor parte de los sistemas sensoriales separan espacialmente los impulsos aferentes procedentes de las neuronas sensoriales para construir un mapa topográfico que define la localización de un estímulo sensorial dentro del entorno, así como las características propias del estímulo. Esta característica no es compartida por el sistema olfativo, ya que el procesamiento del estímulo oloroso no da ninguna información sobre la localización espacial del estímulo olfativo.

Los seres humanos se encuentran entre los peor dotados de los mamíferos para la detección y discriminación de olores, y a pesar de ello pueden distinguir miles de compuestos distintos a través del olfato. La mayor parte de las sustancias olorosas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular y con suficiente volatilidad para ser transportados como vapores hasta las fosas nasales. Las neuronas olfativas tienen gran sensibilidad y especificidad, pudiendo incluso diferenciar los isómeros especulares de algunos compuestos aromáticos. Existe una amplia variabilidad en la capacidad de discriminar olores entre humanos, desde los que pueden diferenciar varios miles a los que carecen total o parcialmente del sentido del olfato consciente. Esta carencia se conoce como *anosmia*, que puede ser total o para un grupo específico de sustancias olorosas, en cuyo caso se habla de *anosmias específicas*, características que suelen ser

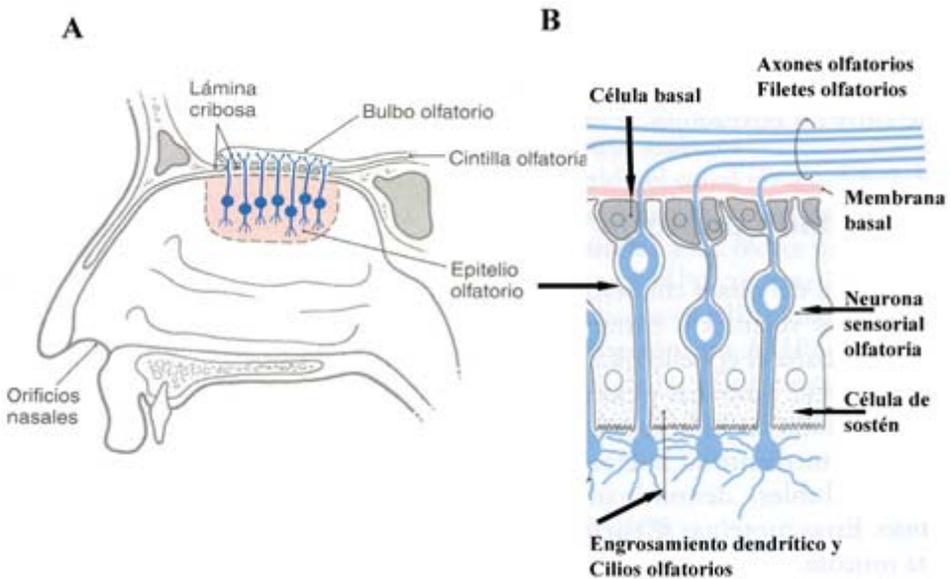
hereditarias. Uno de los ejemplos de anosmias específicas es la pérdida de capacidad olfativa para el almizcle, sustancia segregada por las glándulas del ciervo y que se emplea en perfumes, hasta un 12 por 100 de la población americana analizada en uno de los estudios era incapaz de «olerla».

Antes de analizar la estructura y propiedades de los receptores olfativos y la señal que generan, así como los requerimientos para que los axones se reconozcan entre sí y lleguen al glomérulo específico, analizaremos desde un punto de vista general las estructuras soporte y las células que constituyen el lugar físico donde reside el olfato.

ASPECTOS GENERALES DE ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA OLFATIVO

Las etapas iniciales de percepción del olor tienen lugar en las neuronas olfativas localizadas en el epitelio olfativo, superficie de unos 5 cm² en los humanos, que se encuentra situada en la parte posterior de las fosas nasales. Dejaré que sea don Santiago Ramón y Cajal (1904) quien describa las neuronas olfativas, cito texto: «Según es notorio, la impresión o recepción de los olores se efectúa en la porción superior de la mucosa olfativa, cuya dermis se espesa y ofrece un tono ligeramente amarillento. A este nivel, también el epitelio de células alargadas se modifica, perdiendo sus pestañas y un nuevo corpúsculo aparece: la célula bipolar u olfativa, que representa el verdadero órgano de recepción del impulso o estímulo oloroso. ...Como su nombre anuncia, tratase de corpúsculos nerviosos provistos de dos expansiones: recia la periférica que se termina en la superficie libre por un cabo del cual parte un penacho de finísimas pestañas móviles... La expansión descendente representa al cilindro-eje o axón, lo que da carácter de neurona a la célula bipolar... esta fibrilla recorre indivisa y sin anastomarse una parte del dermis, reúnese luego con otras en apretados hacecillos, sube luego, conservando siempre su individualidad, a través de la lámina cribosa del etmoides y asalta, en fin, el bulbo olfatorio, para terminar arborizándose en el espesor de un glomérulo de este órgano nervioso central». Sorprende a cualquier estudioso del sistema nervioso la precisión y exactitud de la descripción, realizada

hace más de 100 años, de la neurona olfativa y su prolongación hasta llegar a uno de los glomérulos del bulbo olfativo.



Corte sagital a través de las fosas nasales humanas y epitelio olfativo.

FIGURA 1. Sistema olfativo estructuras generales.

A) Se muestra un corte sagital a través de las fosas nasales humanas, donde se puede observar la situación del epitelio olfatorio en relación a la lámina cribosa que permite el paso de los haces de axones sensoriales para alcanzar el bulbo olfativo.

B) Se muestra un esquema del epitelio olfatorio con los tipos de células más relevantes y su ubicación. Los cilios suelen variar entre 10 y 30 y están protegidos por el mucus, que contiene las mucinas que son segregadas por las glándulas de Bowman, que no se muestran en este esquema.

La dendrita periférica de la neurona olfativa está rematada con los cilios y suele contener entre 10 y 30. Estos cilios es donde se encuentran los receptores olfativos en mayor densidad y están cubiertos por el mucus, lo que evita su desecación y facilita la interacción con los estímulos olorosos, ya que también contiene proteínas capaces de interaccionar con las moléculas olorosas y de concentrar los estímulos de esta naturaleza. El epitelio olfatorio contiene además las células de soporte, que son de naturaleza glial o asimilable, y su

función es la de aislar y asegurar el mantenimiento y la independencia de la dendrita periférica de cada neurona olfativa.

Lo mismo que ocurre con todas las células de las mucosas y epitelios tapizantes, las células del epitelio olfativo están sometidas a una rápida renovación, lo que garantiza su funcionalidad a pesar de las agresiones físicas o químicas a las que están sometidas. Existen aproximadamente un millón de neuronas olfativas en nuestro epitelio y su vida media suele ser de 30 a 60 días. Este hecho plantea la necesidad de disponer de células madre progenitoras para poder hacer frente a la renovación neural, esta función la realizan las células basales, situadas en la parte más interna del epitelio olfativo, que pueden dividirse y diferenciarse en neuronas olfativas adultas. Esta renovación obliga a que los nuevos axones reconozcan los haces en los que han de converger para así atravesar la lámina cribosa del cráneo hasta alcanzar su glómulo en el bulbo olfativo. Este hecho, que parece lógico y simple, plantea sin embargo uno de los retos de más difícil abordaje en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso: *¿Cómo se reconocen los axones entre sí y qué señales median en la migración y alargamiento de los axones hasta alcanzar la neurona con la que han de establecer la conexión sináptica específica?* Si además pensamos que todo eso ocurre en un cerebro plenamente desarrollado y con las conexiones ya establecidas, nos damos cuenta del valor que necesitaron los hoy día galardonados para enfrentarse al problema, y la importancia de sus descubrimientos.

LAS PREGUNTAS PARA CONSEGUIR EL PREMIO NOBEL

Los galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de este año, junto con sus equipos de investigación, se plantearon una serie de preguntas para tratar de comprender el funcionamiento de las neuronas olfativas y los mecanismos para captar y diferenciar los estímulos olorosos. Linda Buck y Richard Axel habían trabajado conjuntamente en muchos temas importantes, entre ellos los mecanismos de la memoria y el procesamiento alternativo de algunos RNA mensajeros en *aplysia* y otros invertebrados, pero no es hasta 1991 en que publican conjuntamente el primer artículo describiendo la naturaleza de los receptores olfativos y la existencia de una amplia

familia, lo que abrió las puertas para comprender el mecanismo de la olfacción. Algunos de los aspectos que se analizarán en esta revisión no se corresponden con los trabajos de los galardonados, pero han sido incluidos para dar mayor coherencia y facilitar la comprensión de lo expuesto. Trataremos, pues, de presentar el conocimiento actual del tema, según el esquema siguiente:

1. ¿Cómo es la estructura molecular de los receptores olfativos: familias de receptores?
2. ¿Cómo es la distribución de los receptores en el epitelio olfativo y cómo se selecciona su expresión?
3. ¿Cómo es la transducción de la señal olfativa? Mecanismos implicados.
4. ¿Cómo se reconocen entre sí y llegan al glomérulo los axones específicos?
5. ¿Cuáles son las vías del olfato consciente en el sistema nervioso central?

No se desarrollarán en este artículo los aspectos del olfato inconsciente, también denominada nariz sexual, ya que en los modelos de mamíferos estudiados, sus alteraciones implican cambios en la conducta de apareamiento, defensa del territorio y agresividad. Son varias las preguntas relacionadas con este apartado que, debido a su importancia, necesitan un desarrollo específico.

6. El olfato consciente *versus* el olfato inconsciente: feromonas.
7. ¿Cómo son los receptores de feromonas y cuántos hay? Órgano vomeronasal.
8. ¿Cómo es la transducción de la señal de los receptores de feromonas?

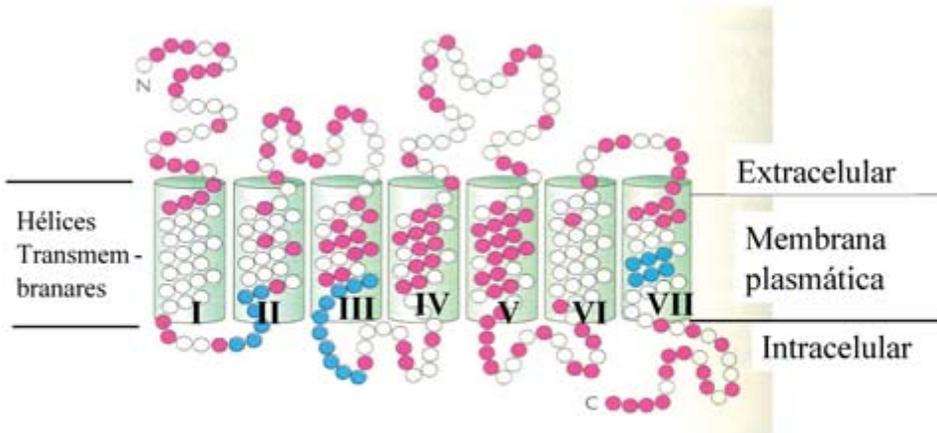
ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES OLFATIVOS

Buck y Axel en 1991 identificaron por vez primera una familia de genes pertenecientes a los receptores acoplados a proteínas G en el epitelio olfativo de rata. La tarea no fue fácil, pues durante mucho

tiempo se especuló con la posible existencia de receptores que de modo análogo a las inmunoglobulinas tuvieran una zona constante y otra variable para responder a la gran variedad de compuestos aromáticos existentes en el entorno. Esta especulación se demostró falsa pero requirió mucho esfuerzo y retrasó considerablemente el abordaje exitoso del problema. Al mismo tiempo, otros estudios bioquímicos sugerían que los receptores deberían pertenecer a la familia de los de siete hélices transmembranares, pues los cilios del epitelio olfativo incrementaban los niveles de AMPc, cuando eran estimulados con sustancias olorosas en presencia de GTP, lo que sugería un receptor acoplado a una proteína G. La estrategia seguida por Buck y Axel consistió en realizar una librería de cDNA de rata y buscar aquellos cDNA que se expresaran principalmente en el epitelio olfativo y codificaran para receptores, mostrando analogía con el β -adrenérgico, que es el modelo de partida para clonar la mayoría de receptores de la familia de siete hélices transmembranares. Además deberían de existir múltiples variantes de estos receptores para dar cuenta de la gran variedad en la percepción de la señal olfativa.

Sus trabajos dieron como resultado el descubrimiento de un primer grupo de 18 receptores olfativos en la rata, que resultaron ser miembros de una familia multigénica extremadamente amplia, que codifica para receptores del tipo de siete hélices transmembranares, tal y como habían supuesto, y cuya expresión está restringida al epitelio olfativo. Trabajos posteriores demostraron que los receptores olfativos representan la mayor familia conocida de receptores en roedores, la rata con unos 1.000 miembros aproximadamente, lo que representa casi un 1 por 100 de su genoma y en ratón hasta 1.500 receptores olfativos. Este porcentaje parece ser incluso mayor en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el cual aproximadamente un 3-5 por 100 del genoma codifica receptores implicados en la olfacción y quimiosensores (Bargmann and Kaplan, 1998).

Receptores olfativos: familia de siete hélices transmembranares



En rata hay 1000 genes diferentes activos

Contienen unos 300-350 aminoácidos.

La mayor variabilidad en la secuencia está en las hélices

IV y V, donde se reconoce la sustancia olorosa.

FIGURA 2. Estructura molecular de los receptores olfativos.

Los receptores olfativos pertenecen a los de siete hélices transmembranares acoplados a proteínas G. Los aminoácidos más variables están representados en rojo, siendo de destacar la zona transmembranar de las hélices IV y V, que es importante en el reconocimiento de la molécula olorosa. Los residuos marcados en azul son los más conservados y son importantes en el reconocimiento de la proteína $G\alpha_{(olf)}$.

Dentro de esta familia de genes existen varias subfamilias, según la conservación de la secuencia, es importante señalar que sólo conservan un 20 por 100 de homología con el receptor de partida, el β -adrenérgico, y que entre sí la homología oscila entre un 30 y un 95 por 100, según los miembros de las subfamilias. Las zonas más variables de estos receptores se encuentran en las hélices transmembranares, sobre todo en las IV y V. Estos residuos, altamente variables, podrían indicar que es el sitio donde las moléculas olorosas establecen su contacto con el receptor. Algunos miembros de los receptores olfativos contienen residuos ácidos en estas posiciones, lo que sugiere que son receptores para compuestos con grupos

aminérgicos, mientras que otros los tienen de naturaleza hidrofóbica. De todos modos, el hecho de que la mayor variabilidad ocurra en los segmentos transmembranares hace que se puedan incluir en el grupo A de los receptores de siete hélices, ya que todos ellos tienen el sitio de unión para el ligando en la zona que queda dentro de la membrana plasmática. Este grupo es el más numeroso y pertenecen entre otros los receptores α y β adrenérgicos, dopaminérgicos, de serotonina, histamina, etc..., y la propia rodopsina y otros pigmentos visuales.

Los genes de los receptores olfativos existen en los vertebrados inferiores y también en los invertebrados. Ya hemos citado que en rata y ratón son aproximadamente 1.000 genes y todos ellos son funcionales, lo que también ocurre en otros mamíferos no primates. El genoma humano codifica entre 500 y 750 genes de receptores olfativos, pero contrariamente a otras especies más de la mitad son pseudogenes. Quiere esto decir que cuando uno de estos receptores se expresa no es funcional y su presencia en nuestro genoma es un recuerdo del pasado de la especie y de su evolución.

Se ha tratado de explicar la pérdida de capacidad olfativa en los humanos por la menor necesidad y dependencia de este sentido para la supervivencia y por la adquisición de fotopigmentos que hacían más sensibles y más ricas las sensaciones visuales. Curiosamente, esta hipótesis se ha visto avalada por el hecho de que los monos americanos que sólo tienen dos fotopigmentos, uno para el azul y otro para el verde, pero no para el rojo, conservan activos el 100 por 100 de sus receptores olfativos. Como la separación de los continentes ocurrió hace unos 30-35 millones de años, la aparición del fotopigmento que capta el rojo, que es la luz con menor energía, debe de ser posterior a ese evento y por ello sólo aparece en los grandes monos y primates que evolucionaron en África y Eurasia. El beneficio de cubrir un rango cromático mucho más amplio les ha hecho menos susceptibles a la pérdida de calidad olfativa y, por ejemplo, en el gorila, el 50 por 100 de los genes de sus receptores olfativos no son funcionales, son pseudogenes, lo mismo que ocurre en el chimpancé. La máxima pérdida se alcanza en los humanos donde los genes olfativos funcionales alcanzan un escaso 30 por 100, es decir, que tenemos unos 200-300 genes funcionales, pero somos capaces de detectar más de mil olores diversos y algunos miembros de nuestra

especie pueden llegar a diferenciar unos 10.000, si son convenientemente entrenados, como los perfumistas. *Este hecho implica que no existen pares inamovibles de olor específico asignado a un receptor específico*, lo que analizaremos en apartados posteriores.

La existencia de múltiples genes plantea el problema de su expresión para poder explicar la especificidad y diversidad de la señal olfativa, aspectos que serán analizados en los epígrafes siguientes.

Distribución de los receptores en el epitelio olfativo y selección de su expresión

El primer aspecto relevante, referente a la distribución de los receptores olfativos, es que cada neurona olfativa expresa un único gen de receptor olfativo. Este descubrimiento fue efectuado por el grupo de Axel en 1993.

Los experimentos de hibridación *in situ* del RNAm, con pruebas para un gran número de receptores olfativos diferentes, demostraron que las neuronas sensibles a un estímulo definido están topológicamente segregadas en un pequeño número de zonas, que aunque amplias están circunscritas dentro del epitelio olfativo. No obstante, dentro de una zona dada, las neuronas que expresan un receptor específico parecen estar distribuidas al azar, más que espacialmente localizadas. El complejo sistema olfativo de mamíferos podría compartimentalizar el epitelio en diversas unidades anatómico-funcionales, de tal modo que cada zona exprese sólo un subgrupo del repertorio total de receptores. El número total de neuronas olfativas no excede de un millón y el de neuronas que expresan un receptor olfativo específico no sobrepasa un par de miles en el mejor de los casos, pues no todos los receptores se expresan con igual eficiencia (Vassar et al., 1993).

La cuestión es cómo conseguir la diversidad y mantener la estabilidad del receptor expresado una vez elegido. El primer aspecto relevante es la inactivación cromosómica para así poder jugar solamente con el grupo de alelos paternos o maternos. Esta inactivación cromosómica se realiza durante la embriogénesis temprana, resultando que unas células expresarán solamente los alelos maternos y otras los paternos.

Otro aspecto importante es que los genes de los receptores olfativos no se reorganizan durante la vida del individuo y la expresión de unos u otros depende de la activación de las zonas previas al mensajero que codifica la proteína del receptor. Este tipo de control se denomina elementos en cis y se sitúa en la secuencia promotora (Chess y col., 1994). Una confirmación un tanto espectacular de que no hay alteraciones somáticas en el DNA en las neuronas olfativas maduras la ha aportado recientemente el grupo de Axel al clonar un ratón a partir del núcleo de una célula olfativa madura (Eggan y col., 2004). La clonación mediante trasplante nuclear ha sido realizada con éxito en diversos mamíferos, desde la oveja al ratón. No obstante, hasta la publicación de este trabajo no había referencias a ratones clonados a partir de células post-mitóticas y en este caso específico es a partir de neuronas que han alcanzado su máximo grado de diferenciación. Para realizar el clonaje tuvieron que salvar múltiples problemas, el primero era generar un ratón en el que todas las neuronas olfativas se diferenciaron expresando una proteína fluorescente verde, la GFP (Green fluorescent protein), para así estar seguros de la procedencia del núcleo, de este ratón modificado genéticamente es del que se extrae el núcleo a una neurona olfativa, cuyas células descendientes estarán marcadas en verde. Los clones fértiles derivados de transferir el núcleo de las neuronas olfativas post-mitóticas en ovocitos son los que se emplearon para generar el ratón, que a parte de ser verde, contenía intacto todo el genoma y sin alteraciones en los genes que expresan los receptores olfativos.

Más allá del éxito de obtener un ratón verde derivado de las neuronas olfativas, lo que es realmente relevante en este trabajo es que demuestra: 1) que el genoma de una neurona post-mitótica con diferenciación terminal puede re-entrar en el ciclo celular y ser reprogramada hasta un estado de totipotencia después del trasplante nuclear. 2) que el patrón de expresión y la organización de los genes de los receptores olfativos en el ratón clonado es indistinguible del de los animales silvestres, indicando que la elección de genes que expresan las neuronas olfativas no implica cambios irreversibles en el DNA.

Una vez que tenemos la neurona olfativa con su receptor específico, éste tiene que ser capaz de captar la señal y después deben de existir mecanismos que la transmitan a lo largo del axón hasta el

bulbo olfativo, de estos dos aspectos, la transducción de la señal olorosa y la señalización hasta el glomérulo específico nos ocuparemos en los siguientes epígrafes.

Reconocimiento e interacción de las sustancias olorosas con los receptores

El número de receptores olfativos en cualquier genoma de mamífero es muy inferior al número de sustancias cuyo olor puede discriminar, esto implica que los receptores olfativos tienen que poder reconocer varias sustancias olorosas, pero la afinidad con que son reconocidas es muy variable. De igual modo sabemos que una sustancia olorosa determinada puede ser reconocida por varios receptores, pero con diferente afinidad por cada uno de ellos. Hoy día, gracias a los trabajos de numerosos grupos, aplicando técnicas eficaces y novedosas, tenemos un amplio conocimiento del tema, pero lo que nos interesa aquí es conocer un poco de *como fue el camino para asignar receptores a un olor, y olores a un receptor*.

Como tantas otras veces el primer par sustancia química (olor)/receptor se estableció para un organismo muy sencillo, el *C. Elegans*. Curiosamente los receptores de este gusano nemátodo permanecieron huérfanos al menos cinco años desde su descubrimiento, hasta que Segunpta y col. (1996) demostraron que estos gusanos cuando sufrían mutaciones en uno de estos genes, el denominado odr-10, perdían su quimiotaxis hacia el diacetilo. Una confirmación definitiva de que el receptor odr-10 del gusano, era un receptor olfativo, la aportó el hecho de que células HEK humanas transfectadas con este receptor respondían al diacetilo, permitiendo la entrada del ión calcio, mientras que las no transfectadas eran incapaces de responder (Wellerdiek y col., 1997). Una vez encontrado el primer par de moléculas odorante/receptor, otros grupos describieron estrategias similares o más sofisticadas, tratando de correlacionar un olor específico y las neuronas olfativas portadoras del correspondiente receptor.

La interacción de los compuestos olorosos con el receptor olfativo activa una cascada de segundos mensajeros que lleva a la despolarización de la neurona sensorial olfativa con entrada de calcio. Esta cascada será analizada en detalle más adelante, pero aquí nos

sirve para ponernos en antecedentes de las estrategias metodológicas empleadas. Uno de los grupos midió las respuestas electrofisiológicas en rata que había sido infectada con adenovirus para dirigir la expresión de un receptor olfativo recombinante (Zhao et al., 1998). Otra aproximación a la funcionalidad de los receptores consistió en diseñar una librería de expresión basada en la heterogeneidad de la región transmembrana de los receptores olfativos y entonces usar la imagen de calcio para identificar los clones que responden a olores particulares (Krautwurst et al., 1998).

Sin duda, la aproximación más exitosa fue la diseñada por el grupo de Linda Buck (Malnic et al., 1999), que utilizó la imagen de calcio para identificar las neuronas que respondían a un determinado olor y después aislar mediante una micropipeta el RNAm de cada una de las células que respondían, ampliando los mensajeros mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a esta técnica se la conoce en inglés como single cell PCR. De este modo consiguió clonar específicamente los receptores olfativos que respondían a cada uno de los compuestos químicamente definidos ensayados. Este amplísimo trabajo confirmó el hecho de que las neuronas olfativas son funcionalmente distintas, ya que cada una de ellas expresa un único receptor olfativo. También permitió confirmar que la zona transmembrana, sobre todo de las hélices IV y V, que es altamente variable, es el sitio de unión del ligando olfativo y que cambios en un único aminoácido de esta región cambian la especificidad del receptor. Usando diferentes aproximaciones se demostró que cada receptor olfativo individual reconoce múltiples moléculas aromáticas que tengan cadenas de similar longitud, por ejemplo, que difieran solamente en dos o cuatro carbonos, y con similares grupos alifáticos. Otro aspecto importante es que algunas moléculas olorosas son reconocidas por múltiples receptores y que existe una correlación positiva entre la longitud de la cadena carbonada y el número de receptores olfativos que es capaz de estimular. Así pues, el sistema olfativo emplea un código combinatorio, como ha sido demostrado por el grupo de L. Buck (Malnic et al., 1999).

Si una sustancia olorosa interacciona con más de un receptor y además un receptor puede ser estimulado por más de una sustancia olorosa, ¿qué es lo que define un olor característico?: La respuesta a esta compleja situación fisiológica y sensorial reside en que es la com-

binación exclusiva de receptores olfativos activados lo que permite distinguir las sustancias olorosas entre sí.

Una vez que los receptores olfativos son activados, y como cada neurona expresa solamente un tipo de receptor, los axones correspondientes a cada patrón de estimulación olfativa envían la señal al cerebro. Pero antes de que la señal viaje hacia el sistema nervioso central, es necesario comprender cómo es la transducción de la señal hasta conseguir despolarizar la membrana y lograr un potencial de acción.

Transducción de la señal olfativa

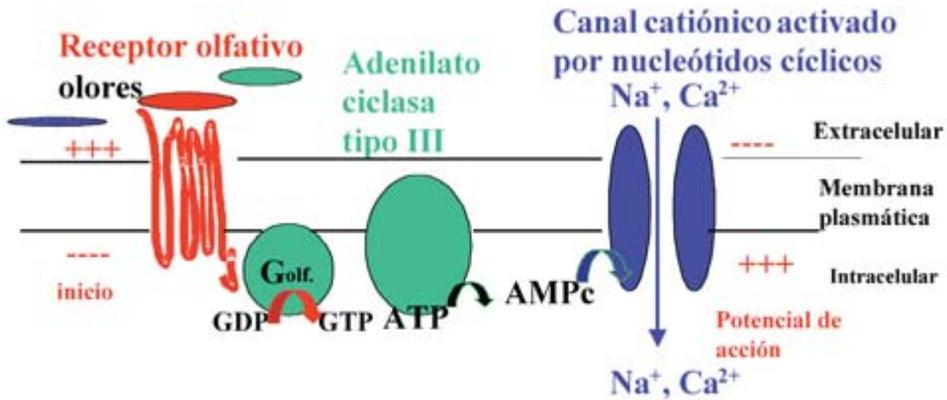
La sustancia olorosa, al unirse al receptor olfativo, induce un cambio de configuración que permite la interacción entre el receptor y una proteína G heterotrimérica. Esta proteína puede ahora intercambiar el nucleótido asociado, GDP, por el GTP, que se encuentra alojado en la subunidad α . La proteína G específica del epitelio olfativo, que además se encuentra casi exclusivamente en esta localización es la $G_{\alpha_{olf}}$ la cual se parece a la G_{α_s} por su capacidad de estimular la adenilato ciclasa. La unión de la $G_{\alpha_{olf}}$ con el GTP hace que se libere del trímero que forma con las subunidades β y γ y active la adenilato ciclasa. La falta de $G_{\alpha_{olf}}$ produce la pérdida total del sentido del olfato, conocida como anosmia, como demostró el grupo de Axel al crear un ratón carente de dicha proteína, el $G_{\alpha_{olf}}^{-/-}$, esto confirma la importancia de la etapa de transducción en la señalización olfativa (Belluscio y col., 1998).

La $G_{\alpha_{olf}}$ se une a la adenilato ciclasa de membrana que al ser activada produce un incremento de los niveles de AMPcíclico en los cilios. Existen nueve isoformas conocidas de la adenilato ciclasa y la que se encuentra en las neuronas olfativas es la denominada de tipo III, que también se encuentra localizada preferentemente en los cilios (Balkalyar y Reed, 1990). Comparada con las otras adenilato ciclasas, esta isoforma parece tener una actividad basal muy reducida.

Experimentos de patch-clamp realizados en 1987, demostraron que cuando el AMPc se aplicaba en la cara citosólica de los parches procedentes de los cilios olfativos, se evocaba una conductancia eléctrica similar a la que había sido previamente descrita en los fotore-

ceptores de la retina. Pero todavía no se conocía el mecanismo que permitía al AMPc iniciar el potencial de acción en la neurona olfativa. El descubrimiento de canales catiónicos operados por nucleótidos cíclicos (CNG) en los conos y bastoncillos de la retina, permitió con posterioridad identificar los canales presentes en las neuronas olfativas. Los canales operados por nucleótidos cíclicos, presentes en la neurona olfativa, son oligómeros compuestos de subunidades α y β (Liu y col., 1996). Cada subunidad tiene seis hélices transmembranares, un dominio aminoterminal altamente variable y una zona carboxilo terminal de unos 130 aminoácidos, cuya secuencia es análoga a la del dominio de unión de los nucleótidos cíclicos en la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa G (PKG). Los canales se abren y se cierran espontáneamente en ausencia del nucleótido cíclico, pero la unión del AMPc a la zona carboxilo terminal hace que se establezca la configuración abierta del canal, permitiendo la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} .

No podemos olvidar que los cilios del epitelio olfativo están localizados hacia la luz del conducto nasal y por lo tanto el medio que los baña no es idéntico ni en concentración ni composición al líquido extracelular del medio interno, por esta razón y en previsión de que los cationes, sobre todo el calcio estén en concentraciones mínimas disponibles, la neurona olfativa ha tratado de amplificar la posible señal y hacerla más eficaz desde el punto de vista de la despolarización. Para este fin existe, muy próximo al canal activado por nucleótidos cíclicos, otro canal en este caso de cloruro que se activa por calcio, incluso a concentraciones intracelulares muy reducidas de este ión. Su activación permite la salida de cloruro hacia la luz nasal y por consiguiente menor carga negativa en el interior. La salida de iones negativos y la entrada previa de los positivos redundan en una mayor despolarización y transmisión de la señal de modo eficaz, aunque la cantidad del compuesto oloroso sea escasa o de poca afinidad. Se genera así el potencial de acción que va a propagarse a través de la dendrita y el soma hasta llegar al axón de la neurona olfativa, siendo el modo de propagación idéntico o similar al de otras neuronas sensitivas y en general de cualquier neurona, entrando en juego los canales de Na^+ y de K^+ voltaje dependientes.



Transducción de la señal olfativa

FIGURA 3. Transducción de la señal olfativa. Cascadas de señalización asociadas al olfato.

La unión de la sustancia olorosa a los receptores olfativos activa una cascada de señales similar a la de otros receptores acoplados a la producción de AMPc.

El receptor, al unirse a la molécula olorosa, sufre un cambio conformacional que induce a la proteína trimérica G(olf) (subunidades α , β y γ), a intercambiar el GDP por GTP. Lo cual induce la disociación de las subunidades y la subunidad $G\alpha_{(olf)}$ con el GTP unido activa la adenilato ciclasa. Este enzima tiene una isoforma específica que está presente solamente en el epitelio olfativo, la adenilato ciclasa tipo III, la cual sintetiza AMPc a partir de ATP. El incremento en los niveles del nucleótido cíclico activa los canales sensibles a AMPc, induciendo la entrada masiva de los iones Ca^{2+} y Na^{+} , lo que induce la despolarización de la célula y la generación de un potencial de acción que viaja a través del axón hasta las estructuras del bulbo olfativo y después al cortex.

La llegada de la señal olfativa a la zona sináptica localizada en el glomérulo permite establecer contacto a las neuronas olfativas con las dendritas de las células mitrales allí localizadas. El neurotransmisor utilizado es el glutamato que sale excitóticamente de la zona presináptica de la neurona olfativa.

La vida media de la neurona olfativa es de 30-90 días, según las especies, y se renuevan continuamente. Como tenemos una serie de pseudogenes que tienen idénticas probabilidades que los genes funcionales de ser seleccionados, una pregunta importante en el funcionamiento de la neurona olfativa es: ¿Qué sucede si el receptor escogido estocásticamente (al azar) es un pseudo-gen, carente de fun-

cionalidad? Es decir, *¿se requiere que la neurona sea funcional para que se mantenga viva y se proceda a la diferenciación terminal?* El grupo de Axel ideó una extrategia genética para examinar la estabilidad del receptor elegido y observaron que las neuronas olfativas inmaduras que expresan un receptor olfativo pueden cambiar la expresión de sus receptores, aunque con muy baja frecuencia. No obstante, las neuronas que expresan un receptor mutado no funcional cambian el gen transcrito con mayor probabilidad, sugiriendo que la expresión de un receptor funcional implica una retro-sígnal que finaliza el cambio de genes. Este proceso de cambio de receptor asegura que cada neurona puede finalmente expresar un receptor funcional y que la elección de este receptor permanecerá estable durante la vida de la célula (Shykind y col., 2004).

Otro ejemplo importante que muestra la necesidad de que la neurona sea funcional para sobrevivir, se debe a los estudios realizados con el canal catiónico operado por AMPc (CNG), que es esencial en la primera etapa de la transducción de la señal olfativa. La subunidad alfa- está codificada en el gen denominado OCNC1 (olfactory cyclic nucleotide channel tipo 1), que se encuentra en el cromosoma X. En animales genéticamente modificados, que sean hembras, tendremos dos cromosomas X, uno paterno y otro materno, y sabemos que en todas las hembras de mamíferos sus células son mosaicos para el cromosoma X, pues sólo uno es funcional y el otro es inactivo. Los ratones hembra homocigóticos en los que se ha alterado este gen, para inactivarlo y al mismo tiempo permitir su visualización, carecen del sentido del olfato. Cuando se obtiene una hembra heterocigótica unas neuronas olfativas tendrán el cromosoma con el gen activo y otras con el gen inactivo. Si tapamos la nariz del ratón la ausencia de estímulo hace que las neuronas olfativas no tengan cometido y por lo tanto sobreviven en el epitelio tanto las células con el gen intacto, como las células con el gen alterado. Pero cuando el ratón está sometido a todo tipo de estímulos olfativos y se requiere la funcionalidad de las neuronas, sólo las que son portadoras del cromosoma con el gen activo permanecen y colonizan todo el epitelio nasal. *Esto sugiere que las sustancias olfativas y la actividad que evocan son críticas para la supervivencia de la neurona en un ambiente competitivo y también que esa actividad es necesaria en el mantenimiento y la organización del sistema olfativo* (Zhao and Reed, 2001).

Hemos completado la etapa de reconocer el olor y transformar la señal química en una señal eléctrica que viaja por el axón hasta el glomérulo. *Pero si hemos tenido que diversificar para poder reconocer los diferentes olores, ¿cómo podemos enviar una señal diferencial para que el cerebro en su cortex sensorial sepa y se entere de que está percibiendo olores diferentes?*

De la diversificación de la señal olfativa y su mantenimiento y memoria nos ocuparemos en el epígrafe siguiente.

Organización topográfica de las proyecciones de las neuronas sensoriales al bulbo olfativo: El apasionante viaje de los axones olfativos a su destino y el reconocimiento de los compañeros de viaje

Como si de *La Odisea* se tratase, este doble título intenta reflejar la gran aventura científica que supuso buscar y descubrir los mecanismos moleculares que permiten la organización de las conexiones en el bulbo olfativo y el mantenimiento de su identidad.

El primer gran hallazgo en este área fue el descubrimiento de que las neuronas sensoriales del epitelio olfativo que expresan el mismo tipo de receptor, aunque se encuentren dispersas, envían sus axones al mismo glomérulo. El trabajo fue realizado por el grupo de Axel, utilizando las técnicas de hibridación *in situ* para el RNAm de un tipo de receptor específico (Vassar et al., 1994). Curiosamente y contra todo pronóstico, estos RNAm también se detectaron dentro de las terminales axónicas de las neuronas sensitivas, donde no hay constancia de síntesis de proteínas, y que se encuentran ya localizadas en el bulbo olfativo, dentro del cerebro. Mediante esta técnica pudieron demostrar que las neuronas que expresan un receptor específico dado, proyectan sus axones a un glomérulo común dentro del bulbo olfativo y que los axones convergen hasta alcanzarlo. La posición de los glomérulos específicos es bilateral y muestran simetría, siendo constante en diferentes individuos dentro de una especie. Estos datos apoyan un modelo en el cual la exposición a un odorante puede resultar en la estimulación de un conjunto de glomérulos espacialmente restringidos, que a su vez pueden ser asociados con áreas específicas de patrones topográficos de actividad en el bulbo olfativo.

Para confirmar que las neuronas olfativas que expresan un receptor específico proyectan con precisión a dos de los 1.800 glomérulos dentro del bulbo olfativo (uno a cada lado) para crear un mapa topográfico de la calidad del olor, el mismo grupo de Axel planeó una serie de experimentos en el ratón, en los cuales inducían la expresión de genes olfativos a los que se había añadido un gen reportero, el cual al expresarse permite la visualización bien directa o indirecta. La visualización directa se hace generalmente añadiendo un gen fluorescente GFP (green fluorescent protein, etc...), y la indirecta añadiendo el gen de la β -galactosidasa, que en contacto con un sustrato artificial produce un depósito de tinción. El grupo de Axel demostró, en estos estudios, que los axones de las neuronas olfativas idénticas convergían a lo largo de la zona interna del epitelio olfativo, eran capaces de atravesar la placa cribosa en pequeños haces y de llegar a su glomérulo específico como un amplio penacho (Mombaerts et al., 1996). Estudios posteriores utilizando la misma metodología, e introduciendo genes olfativos modificados, y combinaciones de otros existentes, conocidas como quimeras, permitieron definir los aminoácidos necesarios para llegar a los respectivos glomérulos y como alterar la trayectoria de los axones. En algunos casos conseguían que los axones anduvieran errantes sin conseguir converger en el glomérulo específico. Pero lo más espectacular lo obtuvieron en los experimentos en que reemplazaban la región codificadora de un gen de receptor olfativo por otro, consiguiendo que la neurona olfativa dirigiera sus axones hacia el glomérulo del gen sustituyente. Estos datos indican que el receptor olfativo desempeña un papel instructor en el establecimiento del mapa topográfico (Wang et al., 1998).

Si los axones de neuronas que expresan el mismo receptor convergen en el mismo glomérulo, la cuestión es conocer los mecanismos moleculares mediante los cuales los axones se reconocen entre sí.

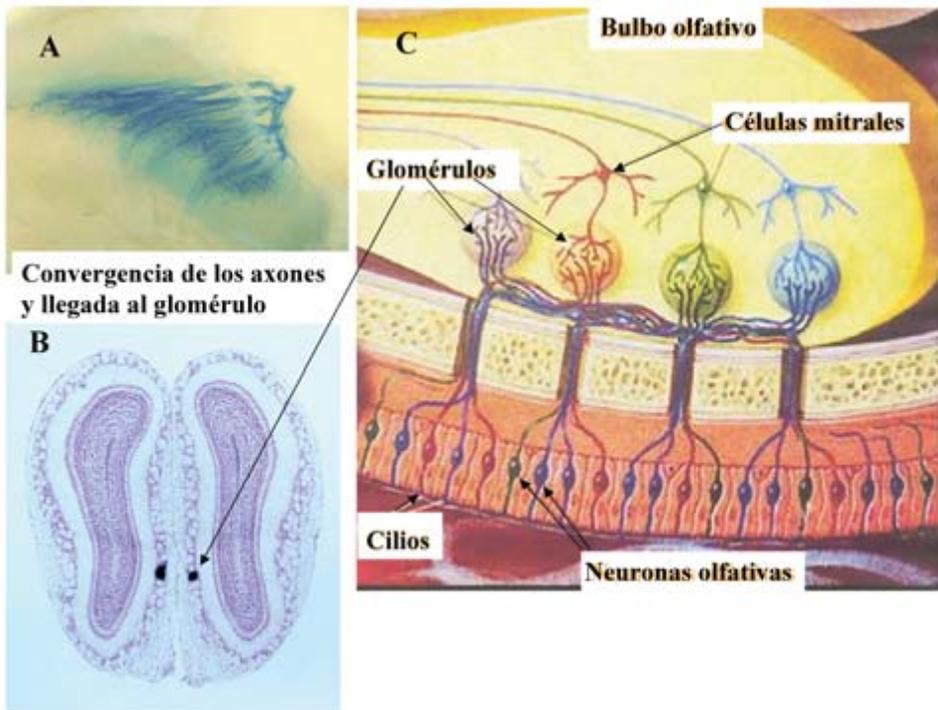


FIGURA 4. Proyecciones de los axones olfativos al glomérulo.

- A) Expresión de un receptor olfativo al que se ha insertado el gen de la β -galactosidasa, para visualizar la trayectoria de los axones de las neuronas olfativas que lo expresan. Se observa que los axones idénticos convergen para alcanzar el mismo punto del bulbo olfativo.
- B) Corte perpendicular del bulbo olfativo donde se observan los dos glomérulos simétricos, uno por cada parte, donde convergen los axones específicos para un tipo dado de receptor (basado en Mombaerts et al., 1996).
- C) Esquema donde puede observarse como las neuronas que expresan el mismo receptor envían sus axones de modo convergente al mismo glomérulo, donde conectan con las dendritas de las células mitrales.

Puesto que la presencia de un receptor olfativo diferente hace que los axones migren a un glomérulo distinto, la información de la migración debería de estar presente en los propios receptores olfativos, pero el problema era descifrar cómo se llevaba a la práctica. Un gran avance se consigue empleando técnicas inmunohistoquímicas cuando el grupo de Axel descubre que la respuesta a este enigma viene dada por la propia naturaleza de los receptores olfativos, los cuales se expresan no sólo en los cilios de las dendritas apicales, sino

también en los axones y la terminal axónica que hace conexión en el bulbo con la célula mitral específica. Los propios receptores sirven de moléculas de guía que reconocen las claves posicionales elaboradas por el bulbo. *La neurona olfativa, por lo tanto, está provista de una identidad que dicta ambos, los olores que reconoce y la diana glomerular que inerva* (Barnea et al., 2004).

Las técnicas inmunohistoquímicas descritas rendían cuentas de una situación, pero no explicaban cómo eran las etapas moleculares del proceso. Para aclarar los detalles surge el magnífico trabajo de Feinstein y Mombaerts (2004), en donde detallan que parte del receptor olfativo contiene la señal de reconocimiento entre axones iguales. Estos autores señalan que ningún modelo, hasta el momento, explica satisfactoriamente como los receptores olfativos funcionan para dirigir los axones de las neuronas olfativas hacia los glomérulos específicos situados en el bulbo olfativo. No obstante empleando la técnica de mutagénesis dirigida, para modificar los genes, formando quimeras y mutaciones puntuales en ratón, demostraron que los receptores olfativos contienen secuencias que les permite reconocerse y llegar de modo coincidente a un glomérulo prefijado. Escogieron para los estudios, entre otros, un par de genes de receptores olfativos que se parecían mucho entre sí, el M71 y el M72 (Mouse 71 y 72), que contienen 309 aminoácidos y solamente 11 diferentes, lo que supone un 96 por 100 de homología. A pesar de esta gran similitud, estos receptores van cada uno a un glomérulo distinto y constituían un modelo asequible para formar todas las posibilidades de mutaciones entre ellos y así identificar los aminoácidos responsables de la llegada al glomérulo específico. A las construcciones de receptores modificados se les añadió un gen reportero, el gen de la β -galactosidasa o la GFP, para poder visualizar su expresión. Las sustituciones que realizaron entre las regiones codificantes de los receptores M71 y M72 de los receptores olfativos de ratón, permitieron intercambiar el destino de ambos axones pudiendo, de este modo, conocer exactamente qué aminoácidos de la secuencia estaban implicados en el reconocimiento de los axones idénticos, en este caso concreto de los 11 aminoácidos diferentes, siete de ellos podían alterar la llegada a la diana glomerular. Esta serie de híbridos de los receptores olfativos M71 y M72 han desvelado un espectro de fenotipos glomerulares que llevan al concepto de que la identidad de los axones es detectada por otros axones donde

está presente el mismo receptor. Los polimorfismos naturales de otros receptores olfativos también generan diferentes identidades axonales.

Cambios en el glomérulo de destino generados mediante mutagénesis dirigida, entre los receptores olfativos M71 y M72.

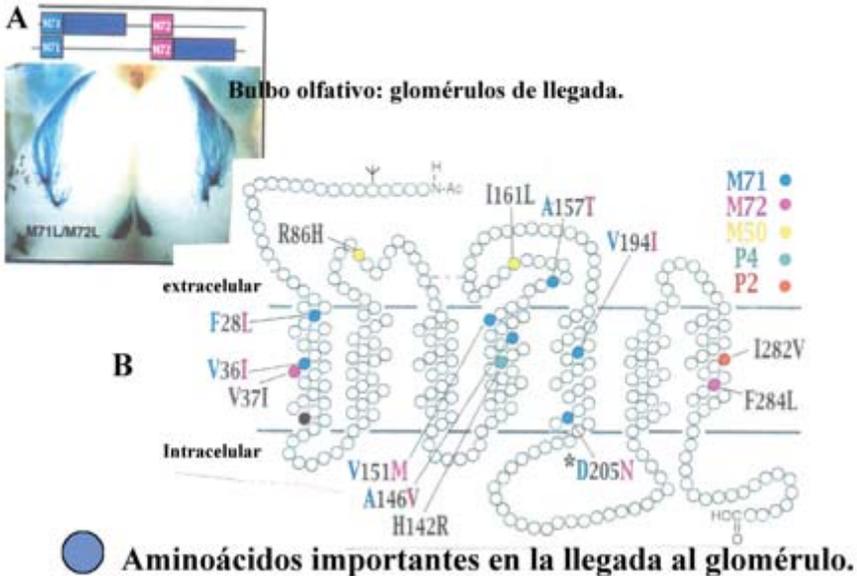


FIGURA 5. Bases moleculares para el reconocimiento y especificidad de las proyecciones olfativas.

A) Llegada al bulbo olfativo de los axones M71 y M72 a su glomérulo, después de realizar cambios en alguno de los 11 aminoácidos en que difieren ambos. Se realizan las construcciones con marcadores que permiten visualizar el recorrido y estudiar sus cambios cuando se induce la expresión del receptor modificado.

B) Indica, de los 11 aminoácidos diferentes, los que son más importantes para cambiar la dirección del axón. Siete aminoácidos pueden alterar la dirección de los axones al glomérulo, los más importantes y por este orden son: En primer lugar, el cambio de ácido aspártico por asparagina en la posición 205 (D205N), señalado por un encuadramiento azul que se encuentra al final de la hélice V es la modificación que causa el cambio más acusado en la dirección de los axones del glomérulo M71 al del M72. Otro cambio que ha resultado muy importante es el de la valina por isoleucina en la posición 194 (V194I) en el inicio de la hélice V. Otros importantes son los cambios en la hélice IV de alanina por valina en la posición 146 (A146V) y de valina por metionina en la posición 151 (V151M). Finalmente, aunque con efectos menores en la direccionalidad de los axones están los cambios en A157T, F28L y V151M (de los datos de Feinstein y Mombaerts, 2004).

Los resultados derivados de la expresión de receptores olfativos híbridos entre dos similares reservaban muchas sorpresas, en primer lugar que el simple cambio de un aminoácido puede alterar el destino glomerular del axón. En segundo lugar, parecía lógico esperar que los cambios en los aminoácidos situados hacia fuera de la membrana jugaran un papel predominante en el reconocimiento, pero fue justo lo contrario, los aminoácidos críticos para el reconocimiento se encuentran distribuidos a lo largo de la proteína y fundamentalmente en los dominios transmembranares.

Ya sabemos cómo llegan al glomérulo los axones y ahora nos planteamos cómo viaja la señal eléctrica generada hasta el neocortex.

Desde el bulbo olfativo al neocortex: la memoria olfativa

Cuando estimulamos las neuronas olfativas con sustancias olorosas podemos examinar las respuestas que se producen en todo el cerebro mediante las técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI). El principio bioquímico funcional reside en que las zonas más activas tienen mayor flujo de sangre para que funcionen los tejidos y el mayor consumo de oxígeno redundante en una mayor proporción de oxihemoglobina. El hierro de la deoxihemoglobina, al tener dos electrones desapareados, funciona como un fuerte imán, lo que no ocurre en la oxihemoglobina. Las técnicas de resonancia magnética nuclear permiten diferenciar estas dos formas a través de su interacción con los protones de la molécula de agua y relacionarlas con el consumo de oxígeno y por lo tanto la actividad cerebral.

Imágenes obtenidas en voluntarios mediante esta técnica no invasiva han permitido conocer las regiones cerebrales en que se procesa la señal olfativa, que implica tanto el cortex olfativo primario, como de modo secundario áreas de la corteza frontal y del hipocampo. Esta llegada al cortex implica un largo viaje desde el bulbo olfativo que aquí veremos de modo somero.

La primera etapa del viaje al cortex se inicia en el bulbo olfativo, que también puede denominarse olfatorio, pues así lo denomina Cajal, aunque actualmente es una denominación menos usada. El

bulbo olfativo es una estructura pareada que reside justo detrás de la cavidad nasal, consta de cinco capas de células y fibras bien delimitadas y tiene una estructura laminar. En la rata y ratón el bulbo olfativo tiene unos 1.800-2.000 glomérulos, y cada semiparte unos 900 a 1.000 diferentes. La situación de los glomérulos que reciben la señal eléctrica correspondiente a un olor, origina un mapa olfatorio que guarda su posición con la llegada de los axones a nivel cortical, de este modo la información de una sustancia olorosa está codificada espacialmente en el bulbo olfativo.

La pregunta es: ¿Cómo consiguen los axones del bulbo olfativo establecer las conexiones adecuadas en el cortex olfativo, cuál es su naturaleza, qué factores de crecimiento necesitan?

Las repuestas requieren un completo conocimiento del desarrollo del sistema nervioso, lo que estamos muy lejos de conocer y quizá en el futuro un Premio Nobel se conceda al conocimiento exacto de formación de alguno de estos circuitos neurales. Veremos aquí algunos aspectos y datos relevantes, aunque parciales.

Los axones sensoriales son excitadores, de naturaleza glutamatérgica y en el glomérulo establecen las conexiones sinápticas con tres tipos de neuronas: las mitrales, las empenachadas y las periglomerulares. Las neuronas mitrales y empenachadas son de naturaleza excitadora, glutamatérgica, y sus axones se proyectan directamente al cortex olfativo, excepto la diferencia en la morfología, parecen asumir funciones y proyecciones similares. Las neuronas periglomerulares envuelven y conectan los glomérulos entre sí, son de naturaleza inhibitoria, GABAérgica, y evitan la sobre estimulación por exceso de señal olorosa.

La dendrita principal de cada célula mitral y/o empenachada solamente conecta con un glomérulo, el número de células mitrales que conecta con un glomérulo es de entre 20 y 50, y no olvidemos que en cada glomérulo convergen los axones de varios miles de neuronas olfativas, lo que supone 100 veces menos en el número de neuronas que llevan la señal al cortex olfativo.

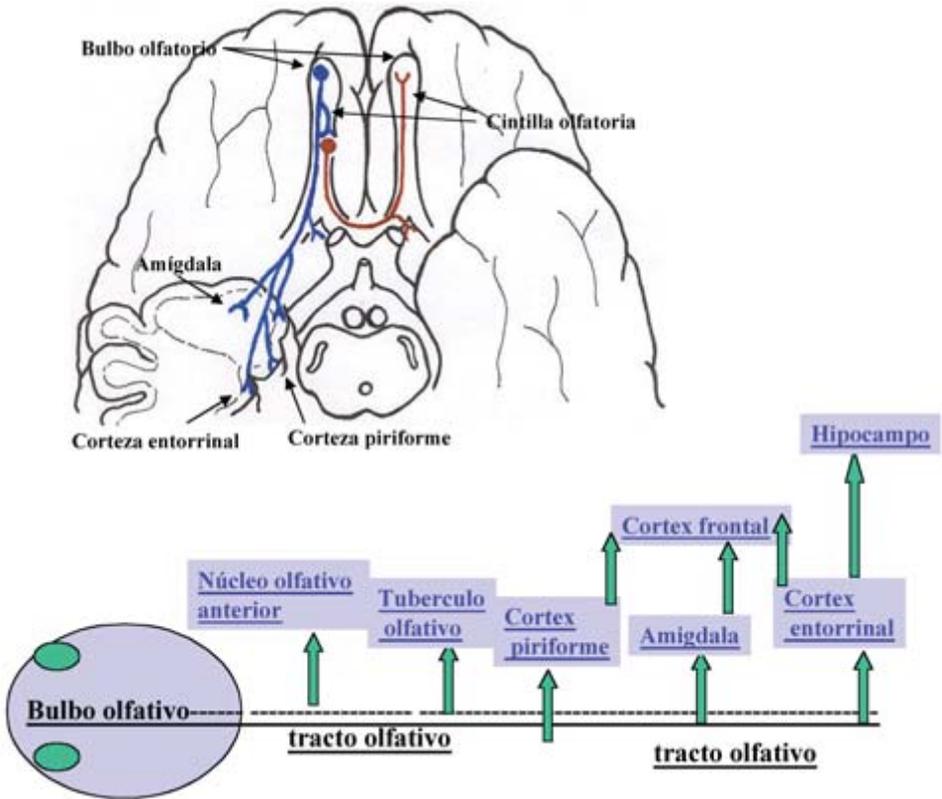


FIGURA 6. Vías centrales de la señal olfativa. Esquema general de las conexiones olfativas y localización cerebral de las principales proyecciones eferentes del bulbo olfativo.

Los axones de las células mitrales tienen que llegar al cortex olfativo y esta conexión en la rata se suele establecer entre el día 15 y el 17 de desarrollo fetal. Es decir, que a partir de ese día la señalización olfativa desde el bulbo hasta el cortex sería funcional. Se han buscado factores de crecimiento neuronal, del tipo del NGF (Nerve growth factor), para estudiar el desarrollo *in vitro* de este sistema, pero la búsqueda fue infructuosa hasta que, rebuscando en viejos papeles, los investigadores se encontraron con un artículo de Maestre de San Juan (1856, no es un error, mil ochocientos cincuenta y seis) en que este histólogo español describe la falta total de

nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía una atrofia congénita de los testículos y miembro viril, publicado en *Siglo Médico*, 131, 211. Hoy día se conoce que el hipogonadismo se debe a que las neuronas que liberan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), no forman sus axones correctamente. Pues bien, sucede lo mismo en la formación de ramas colaterales en los axones de las células mitrales que forman el tracto olfatorio, lo que origina anosmia. La anomalía genética que cursa con estos déficits está ligada al cromosoma X y se conoce como síndrome de Kallman. Este gen codifica una proteína a la que se denominó anosmina-1 y hoy día se conoce que su función es promover el crecimiento fundamentalmente de los axones del tracto olfatorio y la formación de ramas colaterales que establezcan las conexiones una vez que llegan al cortex. En ausencia de este gen, o en animales con el gen bloqueado, el bulbo olfativo se atrofia y desaparece el camino al cortex. *La importancia de este descubrimiento es que la anosmina-1 es el primer factor de crecimiento, o quimio-atractivo que se conoce que es capaz de producir la arborización del axón para formar las conexiones en su lugar de destino, en este caso el cortex olfativo* (Soussi-Yanicostas et al., 2002).

Tenemos los axones del tracto olfatorio que pueden conectar con la corteza olfativa conocida como cortex piriforme y la corteza entorrinal lateral, desde esta última pueden ir al hipocampo, paso esencial en la consolidación de la memoria a largo plazo y también al cortex frontal donde tendremos las áreas de asociación y donde realmente podremos evocar las sensaciones olfativas conscientes que sean más entrañables o repulsivas en nuestra vida.

En contraposición, las vías que salen del órgano vomeronasal, donde están los receptores de feromonas, no llegan al cortex piriforme, sino a la amígdala, y de ahí alguna vez al cortex frontal. Por este motivo «no olemos» las feromonas, pero pueden activar todas las vías de agresividad y defensa (Dulac and Axel, 1995, 1998). Esta es otra historia, la de la nariz sexual, conocida también como olfato inconsciente, y que sin duda será tan apasionante como la del olfato consciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. BALKALYAR, H. A., AND REED, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250: 1403-6.
2. BARGMANN, C. I., AND KAPLAN, J. M. (1998). Signal transduction in the Caenorhabditis elegans nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 279-308.
3. BARNEA, G.; O'DONNELL, S.; MANCIA, F.; SUN, X.; NEMES, A.; MENDELSON, M., AND AXEL, R. (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304, 1468.
4. BELLUSCIO, L.; GOLD, G. H.; NEMES, A., AND AXEL, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron*, 20: 69-81.
5. BUCK, L. AND AXEL, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187. **Este es el artículo histórico y punto de partida.**
6. CHESS, A.; SIMON, I.; CEDAR, H., AND AXEL, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expresión. *Cell* 78, 823-834.
7. DULAC, C., AND AXEL, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206.
8. DULAC, C., AND AXEL, R. (1998). Expression of candidate pheromone receptor genes in vomeronasal neurons. *Chem. Senses* 23, 467-475.
9. EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; GOGOS, J.; CHESS, A.; AXEL, R. AND JAENISCH, R. (2004). Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428, 44-49.
10. FEINSTEIN, P., AND MOMBAERTS, P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117, 817-831.
11. KRAUTWURST, D.; YAU, K. W., AND REED, R. R. (1998). Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 95, 917-26.
12. LIU, D. T., TIBBS, G. R., AND SIEGELBAUM, S. A. (1996). Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* 16, 983-90.
13. MAESTRE DE SAN JUAN, A. (1856). Falta total de nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía una atrofia congénita de los testículos y miembro viril. *Siglo Medico* 131, 211.
14. MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T. AND BUCK, L. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723.
15. MOMBAERTS, P.; WANG, F.; DULAC, C.; CHAO, S. K.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; EDMONDSON, J., AND AXEL, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87, 675-686.
16. RAMÓN Y CAJAL, S. (1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Tomo II, segunda parte, Imprenta y librería de Nicolás Moya, versión francesa de 1904. Capítulo XLI, Corteza olfativa. Versión española en edición de 1992, ISBN: 84-604-4778-2.
17. SEGUNPTA, P.; CHOU, J. H., BARGMANN, C. I. (1996). Odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84, 899-909.

18. SHYKIND, B. M.; ROHANI, S. C.; O'DONNELL, S.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; SUN, Y.; AXEL, R., AND BARNEA, G. (2004). Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* 117, 801-8015.
19. SOUSSI-YANICOSTAS, N.; DE CASTRO, F.; JULLIARD, E. K.; PERFECTINI, I.; CHÉDOTAL, A., AND PETIT, C. (2002). Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal Branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109, 217-228.
20. VASSAR, R.; NGAI, J. AND AXEL, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74, 309-318.
21. VASSAR, R.; CHAO, S. K.; SITCHERAN, R.; NÚÑEZ, J. M.; VOSSHALL, L. B., AND AXEL, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79, 981-991.
22. WANG, F.; NEMES, A.; MENDELSON, M., AND AXEL, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93, 47-60.
23. WELLERDIEK, C.; OLES, M.; POTT, L.; KORSCHING, S.; GISSWELMANN, G., AND HATT, H. (1997). Functional expression of odorant receptors of the zebrafish *Danio rerio* and of the nematode *C. elegans* in HEK293 cells. *Chem. Senses* 22, 467-76.
24. ZHAO, H.; IVIC, L.; OTAKI, J. M.; HASHIMOTO, M.; MIKOSHIBA, K., AND FIRESTEIN, S. (1998). Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*. 279, 237-242.
25. ZHAO, H., AND REED, R. R. (2001). X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*, 104, 651-660.

Vía de la ubiquitina-proteosoma

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Los sistemas intracelulares proteolíticos reconocen y degradan proteínas lesionadas o mal plegadas. La vía de la ubiquitina proteosoma se encuentra implicada en el recambio intracelular de las proteínas y juega un papel importante en la degradación de proteínas reguladoras de vida corta, implicadas en una serie amplia de procesos celulares tales como: regulación del ciclo celular, modulación de los receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento y presentación de antígenos y activación de factores de transcripción. Esta vía utiliza una cascada enzimática, mediante la cual moléculas de ubiquitina se insertan covalentemente a la proteína sustrato. Un paso importante en la cascada proteolítica es el reconocimiento del sustrato por una de las muchas ubiquitina ligasas, E3, lo cual conduce a la poliubiquitinación o señal de degradación. La modificación por poliubiquitinación marca a la proteína para su destrucción y la conduce al complejo proteosoma 26S para su degradación proteolítica.

Palabras clave: Ubiquitina.—Poliubiquitinación.—Proteosoma 26S.—Degradación proteica.—Proteolisis.

ABSTRACT

Intracellular proteolytic systems recognize and destroy misfolded or damaged proteins. The ubiquitin-proteasome pathway is widely involved in intracellular protein turnover. It plays a central role in degradation of short-lived and regulatory proteins important in a broad array of cellular processes, including regulation of the cell cycle, modulation of cell surface receptors and ion channels, antigen processing and presentation and activation of transcription factors. The pathway employs an enzymatic cascade by which multiple ubiquitin molecules are covalently attached to the protein substrate. An important step in the proteolytic cascade

is the specific recognition of the substrate by one of many ubiquitin ligases, E3s, which is followed by generation of the polyubiquitin degradation signal. The polyubiquitin modification marks the protein for destruction and directs it to the 26S proteasome complex for proteolytic degradation.

Key words: Ubiquitin.—Polyubiquitination.—26S Proteasome.—Protein degradation.—Proteolysis.

INTRODUCCIÓN

La célula, la unidad fundamental de la vida, es un lugar en el que miles de reacciones ocurren simultáneamente. Las células coordinan estas acciones a través de mensajes transmitidos por proteínas de un lugar a otro. Estos mensajes son parte de la burocracia que controla momento a momento las acciones celulares. Cuando tales mensajes se alteran el resultado es la muerte o el cáncer. Los mensajes transmitidos por las proteínas han de ser rápidos e inmediatos. De no ser así se vuelven obsoletos y las proteínas han de ser destruidas y hay que preparar un nuevo mensajero que a menudo acarrea instrucciones opuestas.

Como todos los componentes del organismo, el proteoma está también en un estado dinámico de síntesis y degradación. Los distintos mecanismos proteolíticos poseen diferentes requerimientos fisiológicos y permiten al organismo adaptarse a condiciones ambientales y fisiológicas en continuo cambio. Es necesario distinguir entre la destrucción de las proteínas «propias» y las «extrañas». Para evitar la respuesta inmune, las proteínas extrañas de la dieta se degradan «fuera», en el lumen del tracto intestinal. Los dos grupos de proteínas propias —extracelulares e intracelulares— se degradan por mecanismos diferentes.

La vía de la ubiquitina-proteosoma es el principal mecanismo en la célula para el catabolismo proteico, interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras. Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: control del ciclo celular, reparación del DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de an-

tígenos, biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular, respuesta al estrés, etc.

La degradación de una proteína por el sistema de la ubiquitina implica dos etapas sucesivas: 1) conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteína, y 2) degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo proteosoma de 26S, con la liberación de trozos de la proteína y de ubiquitina libre reutilizable. Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la ubiquitina como la degradación de los sustratos ubiquitinados han de estar estrictamente regulados.

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina con la proteína sustrato intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales que conllevan la unión del residuo glicocola del terminal carboxilo de la ubiquitina con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina (K) de la proteína sustrato. Una cadena de poliubiquitina se va elaborando sobre la proteína por adiciones de monómeros de la ubiquitina en sucesivas rondas de ubiquitinación. Estas moléculas de ubiquitina van añadiéndose a residuos específicos de lisina de la última ubiquitina de la cadena. Las proteínas unidas a la cadena de poliubiquitina son reconocidas por el proteosoma para su degradación proteolítica con el concomitante reciclado de monómeros de la ubiquitina por enzimas desubiquinantes.

UBIQUITINA

La ubiquitina fue aislada por vez primera por Goldstein *et al.* [1] a partir de timo bovino y posteriormente se encontró en diferentes tejidos y organismos y al principio se creyó que participaba en la diferenciación de los linfocitos. Es una proteína con 76 aminoácidos y 8,6 kDa, ideal para estudios de plegamiento basados en resonancia magnética nuclear, debido a su pequeño tamaño, elevada estabilidad, ausencia de enlaces disulfuro, excelente solubilidad y predominio de estructuras secundarias con enlaces de hidrógeno. Está formada por cinco láminas beta y una gran hélice alfa (Figura 1).

Esta pequeña proteína se une a las proteínas que van a ser degradadas en un proceso denominado ubiquitinación. La ubiquitina actúa a modo de etiqueta para que la proteína pueda ser reconocida por el proteosoma para su degradación. Un proceso antagónico es aquel catalizado por enzimas antiubiquitinantes que eliminan la ubiquitina de las proteínas.

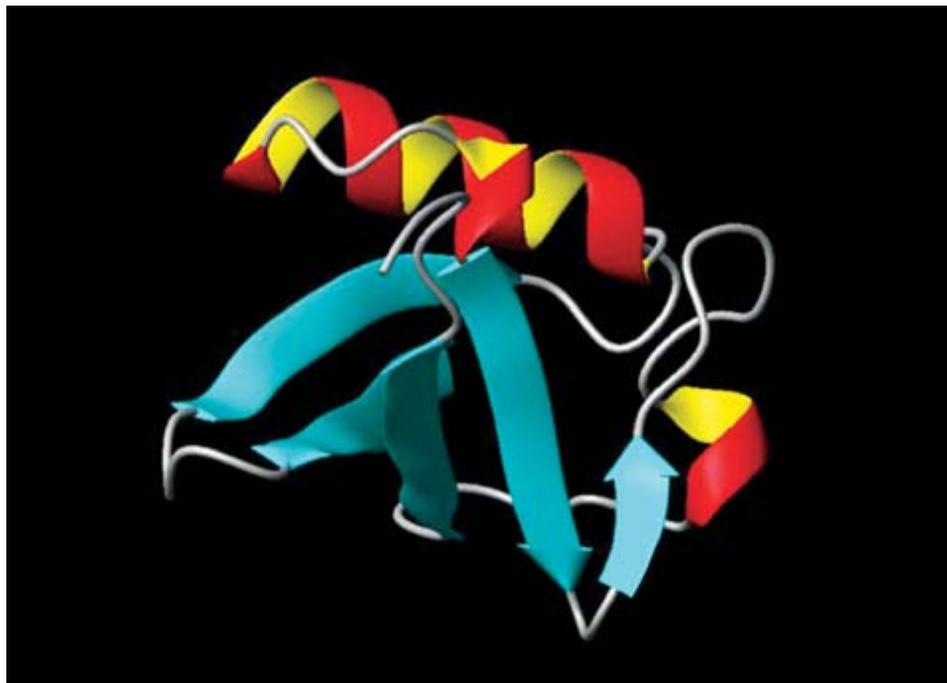


FIGURA 1. *Estructura de la ubiquitina. Cinco láminas beta y una hélice alfa.*

El nombre ubiquitina se debe a su ubicua presencia en casi todos los tipos de células. Es, también, una de las proteínas más conservadas durante la evolución. La secuencia de aminoácidos es casi idéntica desde los insectos al hombre.

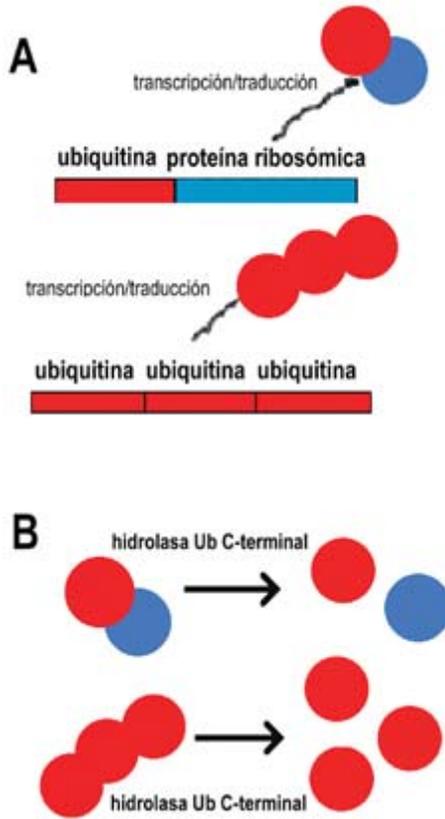


FIGURA 2. *Expresión de la ubiquitina. Genes cuyos productos son proteínas de fusión (ver texto).*

La ubiquitina está codificada por una familia de genes cuyos productos son proteínas de fusión. Los genes Ub existen generalmente en dos estados: A) El gen ubiquitina (rojo) se fusiona con un gen de proteína ribosómica (azul), dando lugar a un producto que es una proteína de fusión ubiquitina-ribosómica. Los genes Ub pueden también existir como una repetición lineal, lo que significa que el producto proteico comprende una cadena lineal de moléculas de Ub fusionadas (poliubiquitina). Después de la fusión de los genes, las proteínas se sintetizan juntas. B) Otra proteína denominada hidrolasa Ub C-terminal separa las proteínas fusionadas en el terminal C de la Ub. De esa manera se libera una Ub individual y la proteína

ribosómica, o se liberan una serie de monómetros de Ub de la cadena de poliubiquitina.

Esta proteína se encuentra en eucariotas y está muy conservada. La secuencia de aminoácidos apenas difiere entre la levadura y el humano. Esta alta conservación sugiere que la mayoría de los aminoácidos que forman la ubiquitina son esenciales, ya que cualquier mutación a lo largo de la evolución se hubiera eliminado por selección natural.

La ubiquitina es una proteína estable al calor que posee una estructura globular. Tiene una gran capacidad para conjugarse con otras proteínas en un proceso que requiere energía [2-4]. Es esta propiedad la que la capacita para encontrarse implicada en muchos procesos celulares. Por ejemplo, la ubiquitina se conjuga con la ciclina durante las fases G1 y M del ciclo celular, jugando un importante papel en la regulación de dicho ciclo. La ubiquitina interviene también en la reparación del DNA, embriogénesis, la regulación de la transcripción, la apoptosis, etc.

Función de la ubiquitina

Las proteínas existen como una cadena lineal de aminoácidos que puede degradarse con el tiempo, ya que tal reacción es termodinámicamente favorable en medio acuoso. La degradación temporal de las proteínas se denomina recambio proteico «protein turnover». La relación entre la degradación de una proteína y su síntesis es lo que determina la concentración de esa proteína dentro de la célula. De este recambio proteico se deduce que algunas proteínas tienen una vida media larga y otras una vida media corta. Las primeras constituyen la mayoría de las proteínas celulares, mientras que las de vida corta son típicamente proteínas reguladoras clave y proteínas anormales o defectuosas. Las proteínas anormales suelen encontrarse parcialmente plegadas.

La ubiquitina tiene una función muy importante, que es la vigilancia del recambio proteico en la célula, regulando estrictamente la degradación de proteínas específicas. Mediante la degradación proteica, las células pueden rápidamente eliminar una proteína que, a

su vez, regulaba otra función. Esto es lo que ocurre con un factor de transcripción necesario para la expresión de un gen particular. Además, esta forma de control es muy efectiva, ya que la eliminación de una proteína reguladora asegura que el proceso regulador efectuado por esa proteína se ha desconectado. En este contexto, una estrategia alternativa es simplemente inactivar las proteínas no deseadas, cambiando su conformación.

La simple hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas no necesita energía, sin embargo, la ubiquitina funciona de manera dependiente del ATP. La razón es que para degradar determinadas proteínas, éstas tienen que ser ubiquitinadas o específicamente marcadas para ser reconocidas por la maquinaria que va a realizar la degradación. La ubiquitina no degrada proteínas, su misión es etiquetarlas para la degradación que va a ser efectuada por el proteosoma 26S.

Conjugación de la ubiquitina

El proceso de conjugación de la ubiquitina, demostrado por Avram Hershko, es reminiscencia de la activación de los aminoácidos y ocurre en tres etapas: 1) En una reacción dependiente de ATP, el carboxilo terminal de la ubiquitina se conjuga mediante un enlace tioéster con el enzima activador de la ubiquitina E1. 2) La ubiquitina se transfiere a un grupo SH del enzima conjugador, transportador de ubiquitinas (E2). 3) La ubiquitina ligasa E3 transfiere la ubiquitina activada en E2 a un grupo ϵ amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico. Al parecer E3 es clave en la selección de la proteína a degradar.

El enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina. En esta reacción, la ubiquitina se une al enzima activador de la ubiquitina (ubiquitin activating enzyme) E1, mediante un enlace tioéster de alta energía, entre el carboxilo terminal del residuo de glicocola y el residuo de cisteína del sitio activo del enzima E1 (E1-S-Ub). En esta reacción el enzima E1 hidroliza el ATP a AMP y PPi, con la intermedia formación de un E1- ubiquitin adenilato (Figura 2). La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 a un miem-

bro de una familia denominada proteína transportadora de ubiquitina (ubiquitin carrier protein) E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1 (E2-S-Ub). La ubiquitina, de esta manera, puede ser transferida directamente desde el enzima E2 al sustrato proteico, al que se une mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo amino de lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación [5].

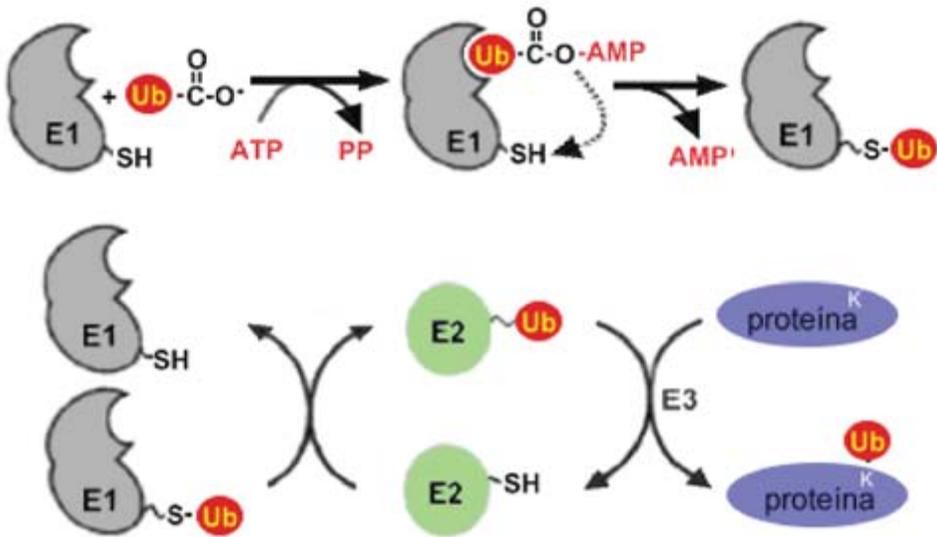


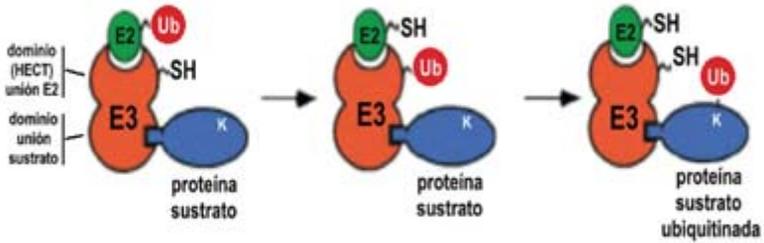
FIGURA 3. Una molécula de ubiquitina se adenila en presencia del enzima E1 y ATP.

Posteriormente, la ubiquitina se une por su carboxilo terminal a un grupo SH de un residuo cisteína en E1, formando un enlace tioéster de alta energía y liberando AMP. La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 al enzima transportador E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1. La ubiquitina se transfiere directamente al sustrato proteico mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación.

El enzima E1, activador de la ubiquitina, es esencial en la ubiquitinación y degradación proteica. Su inactivación a temperatura elevada causa la pérdida de un 80 por 100 de la proteólisis [6]. Existe un solo E1, producto de un solo gen. El enzima E2 es la proteína transportadora de la ubiquitina. Existen 50 tipos diversos, que son polipéptidos pequeños de unos 150 residuos que contienen en su sitio activo un residuo de cisteína, además de presentar una identidad elevada entre ellos. El enzima E3, ubiquitin-ligasa [7], es un polipéptido de 225 kDa, que reconoce el objetivo. E3 actúa a modo de puente de interacción entre E2 y el sustrato. Existen más de 100 tipos de E3 con especificidad para un solo sustrato. E3 se muestra en dos formas: con dominio HECT y con dominio RING finger, ambos poseen también dominios de enlace a E2 (Figura 4).

El dominio HECT de la ligasa E3 debe su denominación a *Homologous E6-AP C-terminus*, siendo E6-AP un factor celular que induce la poliubiquitinación de p53, requerida para la transformación mediada por el virus del papiloma humano. El dominio HECT consiste en una secuencia de 350 aminoácidos con una protuberancia helicoidal N-terminal de 100 aminoácidos como una mezcla separada de hélices α y láminas β , que incluye una cisteína cerca del N-terminal, directamente implicada en la transferencia de ubiquitina. Varios motivos WW actúan como sitios de unión de fosfoserina. Las ligasas HECT-E3 sirven como adaptadores para unir el sustrato a una E2 específica, formando un intermediario en el cual la ubiquitina se une a la cisteína conservada. El dominio RING finger de la ligasa E3 debe su denominación a: *Really Interesting New Gene*. Contiene una estructura en doble bucle rica en cisteína formados por dos átomos de Zn. Este dominio actúa a modo de soporte donde se unen el enzima y el sustrato o subunidades juntas. Las ligasas RING finger E3 incluyen tanto las de cadena sencilla como los grandes complejos APC y SCF implicados en el ciclo celular. Una complicación adicional para estudios genómicos es que algunas las ligasas E3 son complejos de varias subunidades proteicas [8].

A. dominio HECT



B. dominio RING

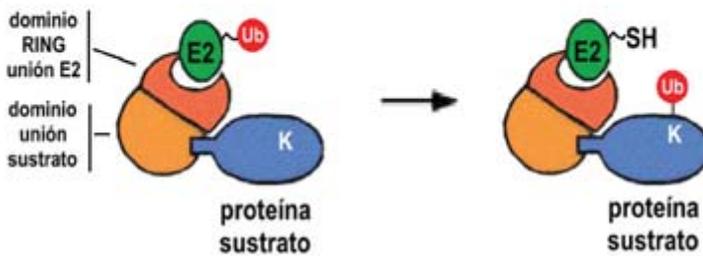


FIGURA 4. Formas de la ubiquitina ligasa E3. A) Dominio HECT. B) Dominio RING finger.

La diversidad de la maquinaria ubiquitina-proteosoma la proporciona las múltiples formas de E3 con capacidad para reconocer a un grupo específico de sustratos.

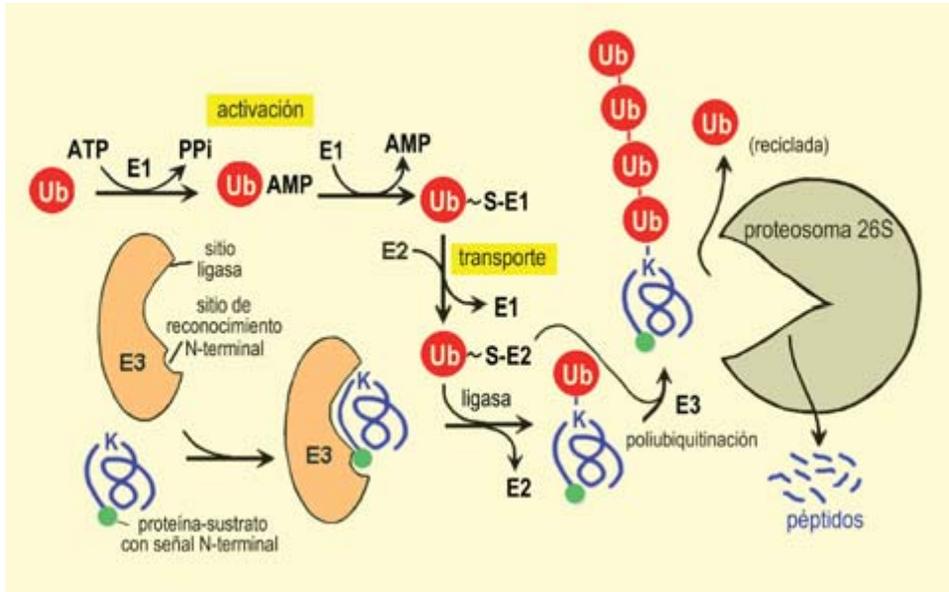


FIGURA 5. Mecanismo de la vía ubiquitina proteosoma donde se muestra en la E3 ligasa los sitios de reconocimiento del N-terminal de la proteína y el sitio catalítico ligasa.

Xie y Varshavsky [9] han demostrado que Ubr1p y Ufd4p componentes de dos diferentes ligasas E3, interaccionan directamente con el proteosoma 26S. Upr1p se une específicamente a las proteínas Rpn2p, Rpt1p y Rpt6p del complejo 19S, y Ufd4p se une a la Rpt6p. Estos hallazgos sugieren que una ligasa E3, unida al sustrato, participa en el envío de sustratos al proteosoma.

Desubiquitinación

Las proteínas ubiquitinadas no sólo son sujetos de la degradación, pues el proceso de ubiquitinación es reversible y dichas proteínas pueden perder la cadena de ubiquitina mediante la acción de unas enzimas denominadas desubiquitinasas. Estos enzimas desubiquitinantes o isopeptidasas (UCH, UBP, DUB) son responsables de la vuelta de la ubiquitina a su estado monomérico, manteniendo el «pool» celular de ubiquitina funcional (Figura 6). Los sustratos de estos enzimas desubiquitinantes incluyen:

- a) formas precursoras de la ubiquitina;
- b) conjugados resultantes de reacciones colaterales no específicas de E1-S-Ub / E2-S-Ub con nucleófilos celulares; y
- c) sustratos ubiquitinados y cadenas poliubiquitinadas unidos covalentemente.

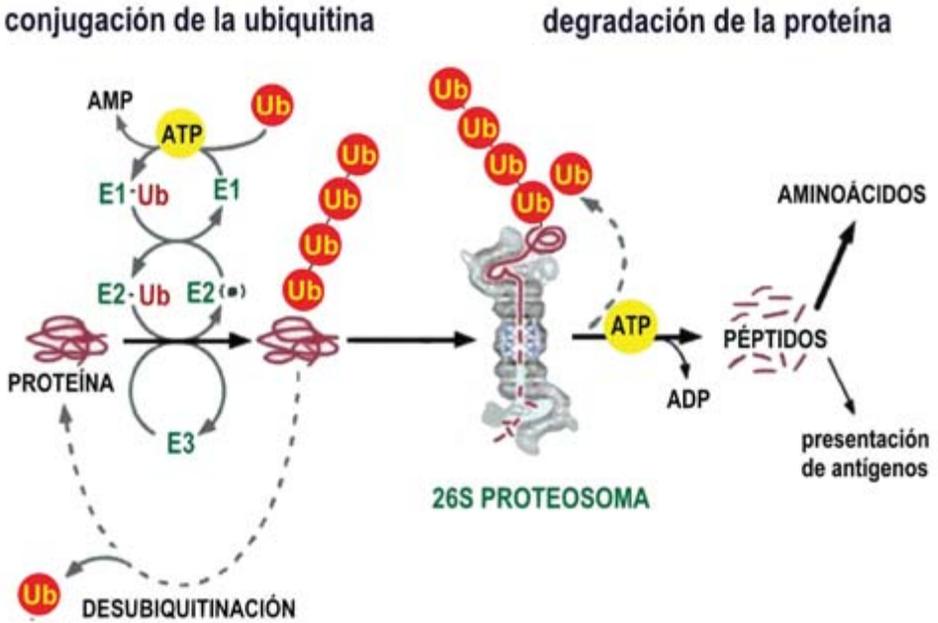


FIGURA 6. Liberación de monómeros de ubiquitina para su reutilización. La ubiquitina puede ser liberada a partir de la propia proteína ubiquitinada por acción de los enzimas desubiquitinantes, como proceso inverso al de conjugación. Otra vía es mediante las isopeptidasas presentes en el complejo 19S del proteosoma.

Etiqueta Sumo

A veces son sutiles diferencias las que condicionan el destino de las proteínas. Así como con la señal de ubiquitina, la proteína está condenada al desguace, si en ese mismo lugar tuviera la etiqueta SUMO, dicha proteína se «salvaría» de ser degradada por el proteosoma. Por un proceso enzimático similar al de ubiquitinación, la

proteínas pueden ser «sumoiladas», es decir, se les coloca la marca o etiqueta SUMO. Estas proteínas ya no se degradan, SUMO les ha cambiado su destino intracelular. Por ejemplo, una proteína de citoplasma que está «sumoilada» puede ir a núcleo y allí regular la transcripción del DNA.

Proteolisis: la señal de destrucción

Hasta los primeros años ochenta del pasado siglo, la degradación proteica fue un área de investigación poco atendida por los científicos, ya que la mayoría de ellos se encontraban ocupados en describir el código genético y su traducción al proteoma. Se pensaba que la destrucción de las proteínas celulares era un proceso terminal no específico. Aunque se sabía que las proteínas tenían que destruirse, no se apreció entonces, en toda su magnitud, la especificidad del proceso y su repercusión en el control de numerosos procesos celulares. El descubrimiento del lisosoma por Christian de Duve no produjo cambios significativos en estas ideas, ya que estaba claro que este orgánulo se encuentra implicado principalmente en la degradación de proteínas extracelulares y sus proteasas no eran sustrato-específicas. El descubrimiento de la cascada compleja de la vía ubiquitina-proteosoma supuso una revolución y a partir de aquí, la degradación de las proteínas ha adquirido una nueva dimensión. Hoy se sabe, gracias a los trabajos de los investigadores premiados con el Nobel 2004 [2-5, 10], que la degradación de las proteínas celulares mediante el sistema ubiquitina es un proceso complejo, enormemente controlado en el tiempo y estrictamente regulado, que se encuentra involucrado en numerosos procesos básicos de la vida y la muerte de la célula, en la salud y la enfermedad.

Durante muchos años, el concepto que pretendía atribuir una significación fisiológica a la proteolisis intracelular fue ampliamente descartado, porque degradar proteínas, de una manera programada, parecía un desperdicio energético. También fue rechazado otro concepto que trataba de encontrar a la destrucción específica de proteínas, un papel en la regulación fisiológica de las vías de transducción de señales, ya que sería necesario sintetizar las proteínas de nuevo. Tales prejuicios resultaron erróneos, ya que las proteínas son degradadas continuamente de acuerdo con las necesidades fisiológicas. La

proteolisis intracelular tiene componentes lisosómicos y no lisosómicos, siendo los últimos los mediados por el sistema de la ubiquitina-proteosoma. Debe existir interrelación entre ambas formas de proteolisis que están comenzando a ser aparentes.

¿En qué consiste la proteolisis mediada por ubiquitinación? La ubiquitina al unirse a proteínas, éstas quedan marcadas para su destrucción. Para que este marcaje sea posible es preciso que la ubiquitina se active previamente en un proceso que consume energía. Dicho de otro modo: la ubiquitina es una etiqueta costosa que marca a las proteínas para que sean posteriormente destruidas. El otro protagonista del proceso es el proteosoma, una gran molécula de forma cilíndrica que reconoce y se une a las proteínas ubiquitinizadas y las destruye en su interior consumiendo también energía. Antes de que esto tenga lugar, las unidades de ubiquitina se liberan para ser reutilizadas. Aunque costoso, este procedimiento es rápido y eficaz.

La proteolisis está mediada por proteasas dependientes de ATP, esenciales, intracelulares y ubicuas, denominadas proteosomas o proteasas multicatalíticas. Los proteosomas degradan una amplia variedad de proteínas citoplásmicas, nucleares y de membrana, que hayan sido marcadas para su degradación mediante la inserción de moléculas de ubiquitina [5, 11, 12]. Los proteosomas de eucariotas son grandes complejos proteicos de alrededor de 2,500 kDa, con arquitectura modular [13, 14] (Figura 7). El proteosoma es una proteasa multimérica, que cataliza el paso final de la degradación de las proteínas intracelulares, vía de ubiquitina-proteosoma. El proteosoma existe en múltiples formas en las células eucariotas. En todas las isoformas se encuentra el núcleo catalítico (CP) conocido como proteosoma 20S. La hidrólisis del ATP se requiere para el desplegamiento de la proteína que le permita la accesibilidad al núcleo catalítico.

El núcleo catalítico del complejo, el proteosoma 20S, de 720 kDa, es una partícula cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete subunidades diferentes cada uno, que están presentes en dos copias y en una sola localización, de forma que la partícula presenta una simetría doble [11, 13, 15, 16] (Figura 7). Los cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos están formados por subunidades α o β , unidas axialmente formando una estructura $\alpha \beta \beta \alpha$, con centros

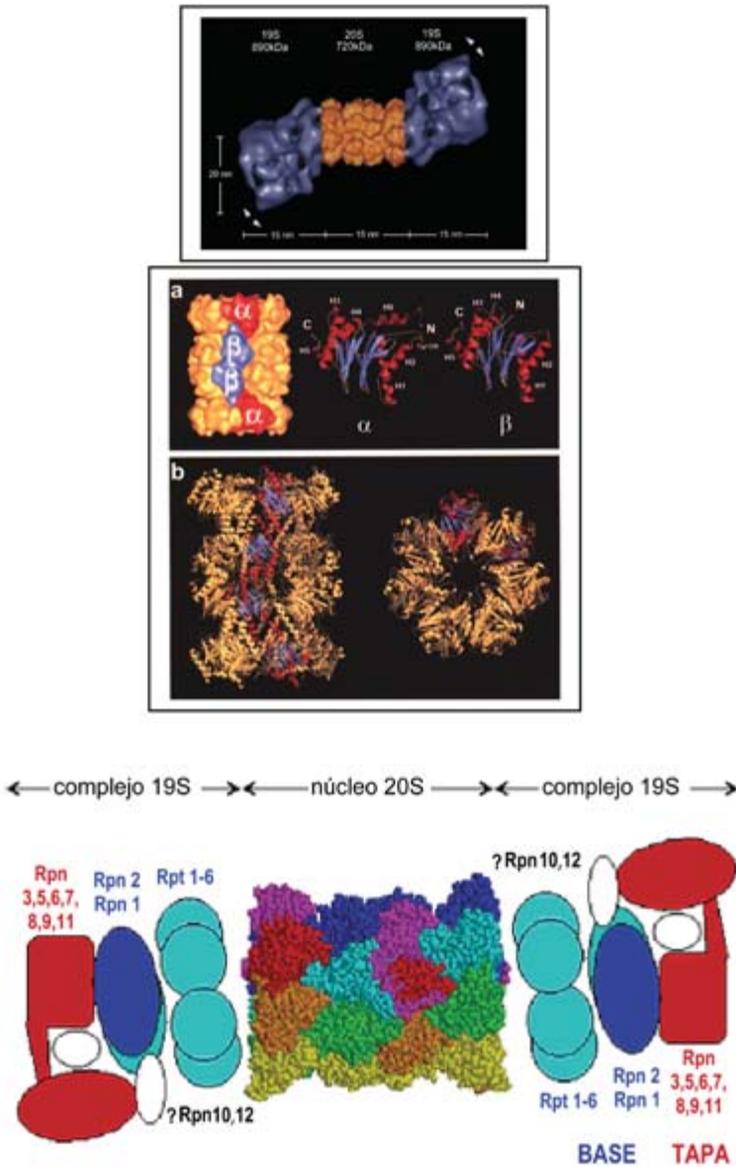


FIGURA 7. Distintas representaciones del proteosoma 26S.

multicatalíticos localizados dentro de la cavidad interna de las subunidades β . La cavidad interna posee un diámetro de 13 Å (Figura

ra 6). El proteosoma 20S se caracteriza por tres actividades proteolíticas distintas: tipo quimiotripsina (Tir o Fen), tipo tripsina (Arg o Lis) e hidrolasa peptidilglutamil (Glu).

Las subunidades del proteosoma 20S de levadura son de dos clases filogenéticamente diferentes, relacionadas a las dos subunidades α y β del proteosoma de las arqueobacterias [17] y se denominan subunidades α y β [18]. Las subunidades α no son catalíticamente activas y forman antecámaras de la cavidad central del complejo 20S, que está formado por las subunidades β . En los proteosomas de *Thermoplasma acidophilum* todas las subunidades β son transcritas y traducidas a partir de un solo gen y se expresan como precursores. En el proceso de maduración de las partículas, todas las copias de la subunidad β llegan a ser activas, de forma que se forman dos anillos con siete sitios catalíticos cada uno en las paredes internas de la cámara central. El aminoácido treonina N-terminal está expuesto en la subunidad β como un nucleófilo catalítico en la hidrólisis del enlace peptídico [19-21]. En base a la estructura cristalina del proteosoma 20S del *T. acidophilum*, la distancia entre las treoninas del sitio activo se considera el patrón molecular que determina la distribución de la longitud de los péptidos generados por el proteosoma. La clasificación del proteosoma 20S como una treonina proteasa se debe al reconocimiento covalente de un residuo Treo en una subunidad β en proteosomas de mamíferos por el inhibidor específico del proteosoma, la lactacistina, un metabolito fúngico [22].

La forma del proteosoma que reconoce y degrada estas proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S. Este complejo multienzimático de 2.500 kDa de masa molecular está formado por el núcleo catalítico de 20S, antes mencionado y dos copias de un complejo regulador de 19S (Figura 7).

El complejo regulador (RP) está compuesto de 18 subunidades de tamaños diferentes, desde 25 kDa a 110 kDa y hasta la fecha se le conocen las siguientes misiones: receptor para la cadena de ubiquitina, actividad ATPasa necesaria para desplegar la proteína y actividad isopeptidasa desubiquitinante. RP está formado por una base, en íntimo contacto con el núcleo de 20S y con la entrada al canal y una cubierta o tapa. Las subunidades de este complejo RP se clasifican en Rpt (trifosfatasa RP) y Rpn (RP no ATPasa).

La base contiene Rpt 1-6 (de 48 kDa cada una) formando un anillo hexamérico en contacto directo con el anillo de subunidades α del extremo del núcleo 20S y tienen similitud de secuencia con las proteínas AAA (ATPasas Asociadas con Actividades celulares). Las proteínas AAA son enzimas implicados en el transporte de membrana en el cual se verifican movimientos interdominios en conjunción con la hidrólisis del ATP. Estos seis componentes Rpt se requieren para la funcionalidad del proteosoma 26S. Rpn 1 y Rpn2 son repeticiones ricas en leucina. Rpn 10 se encuentra en el dominio de unión a la ubiquitina. Existen además repeticiones KEKE. Las funciones de la tapa o cubierta del RP incluyen el reconocimiento y eliminación de las cadenas de ubiquitina de la proteína sustrato [23, 24] (Figura 9).

Cada RP (complejo de 19S) es de mayor tamaño que el CP (complejo de 20S). El menor coeficiente de sedimentación del RP se debe a su estructura menos compacta.

La ubiquitinación intensifica la unión de las proteínas al RP, posiblemente porque la ubiquitina prolonga el tiempo de unión al proteosoma para que se verifique el desplegamiento, acontecimiento que es limitante. Si se aumenta la estabilidad de la proteína sustrato, por ejemplo, por unión a un ligando de alta afinidad, el ritmo de degradación se reduce debido a un desplegamiento más lento. Esto sucede cuando el análogo del sustrato metotrexato se une a la dihidrofolato reductasa. Las cadenas de poliubiquitina elevan significativamente la afinidad de una proteína para el RP.

La proteólisis por el proteosoma no es arbitraria, sigue un método. Aunque las unidades catalíticas actúan como endopeptidasas, porque no son las uniones terminales las que se rompen, el modo de acción preferido es por roturas sucesivas comenzando cerca del N-terminal y produciendo fragmentos de 4 a 25 aminoácidos, con una media de 8 a 9 residuos. Como la proteólisis se verifica siguiendo un proceso, las roturas se verifican de manera secuencial, una tras otra.

El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es: 1) Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S; 2) despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP; 3) introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido

la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas; 4) rotura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos, y 5) salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto.

Señales de degradación

¿Qué es lo que determina que una proteína sea marcada para la degradación? Las proteínas contienen una serie de señales que aparentemente son reconocidas por la vía de la ubiquitina:

1. N-degrón. En 1986, Varshavsky [25] demostró la existencia de una correlación entre la vida media de una proteína y su aminoácido N-terminal. Esta observación dio lugar a la regla del N-terminal (N-end rule), mediante la cual se puede predecir la vida de una proteína en base a su residuo N-terminal. Por ejemplo, las proteínas que tienen Ser como aminoácido N-terminal tienen vida larga, con vida media de más de 20 horas, mientras que las que tienen Asp como aminoácido N-terminal, tienen una vida media de sólo 3 minutos. Se desconoce el mecanismo que acopla el reconocimiento del aminoácido N-terminal con la vida media de la proteína. Sin embargo, es interesante destacar que la regla del N-terminal se aplica a las bacterias, aunque ellas no contienen ubiquitina.

2. Ciertas secuencias de aminoácidos parece que son señales de degradación. Una de tales secuencias se conoce como PEST, porque secuencias cortas de unos ocho aminoácidos están enriquecidas con Prolina, ácido glutámico (E), Serina y Treonina. Un ejemplo es el factor de transcripción Gcn4p, proteína de 281 aminoácidos cuya secuencia PEST se encuentra en las posiciones 91-106. La vida media normal de esta proteína es de unos 5 minutos, pero si se elimina la secuencia PEST, la vida media se eleva a 50 minutos.

3. Algunas señales de degradación pueden estar enmascaradas u ocultas si forman parte de interacciones proteína-proteína, o por inserción covalente de grupos fosfato o cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Ambos mecanismos permitirían así un mejor control, ya que esta señal de degradación sólo necesita ser desenmascarada para que la proteína pueda ser marcada para degradación. Las señales pueden también estar ocultas en el núcleo hidrofóbico. Esto

explica porqué proteínas mutantes o parcialmente plegadas son más propicias para la degradación. Cuando tales proteínas existen en su estado nativo, las señales están ocultas y la proteína tiene vida larga, pero en un estado desplegado, las señales pueden ser detectadas por la maquinaria de la ubiquitina. Esta reacción parece estar obstaculizada por la actividad de las carabinas moleculares.

4. En todas las ciclinas se han localizado secuencias señalizadas de degradación denominadas cajas de destrucción (*destruction box*), formadas por nueve aminoácidos RAALGNISN, que se encuentran presentes entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica.

5. Motivos KFERQ: son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para proteólisis lisosómica, siendo este motivo una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Estas secuencias hacen susceptibles de la degradación lisosómica a aquellas proteínas que la presentan en ciertas condiciones de estrés, como puede ser la retirada del suero en cultivo o en tejidos y organismos por inanición.

Procesamiento de los antígenos por el proteosoma

En los mamíferos la activación del sistema inmune conduce a la liberación del interferon γ . Esto origina que tres subunidades de la partícula núcleo CP (20S) sean reemplazadas por subunidades sustitutas. Los péptidos generados por proteólisis en este proteosoma alterado son reconocidos por proteínas TAP (Transporter Associated with antigen Processing), transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos y transportadas desde el citosol al retículo endoplásmico. Cada péptido se sitúa en un surco en la superficie de una molécula de histocompatibilidad de la clase I (MHCI). Este complejo se mueve a través del aparato de Golgi y se inserta en la membrana plasmática donde es reconocido por los linfocitos T CD8⁺.

Vía de la ubiquitinación-proteosoma y control del ciclo celular

Sin duda alguna, uno de los descubrimientos más importantes en la reciente historia del ciclo celular ha sido reconocer que los reguladores del crecimiento celular están controlados por proteólisis. Aunque este concepto es reciente, desde el descubrimiento de las ciclinas, se vislumbraba la existencia de acontecimientos proteolíticos que podían controlar las transiciones del ciclo celular. Entre las proteínas a degradar se incluyen la mayoría de las ciclinas, los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (ICDK), factores de replicación del DNA, las securinas, que inhiben la pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas después de la replicación del DNA y por supuesto el mismo factor de cohesión, cohesina. El control de la degradación proteica se encuentra a nivel de ubiquitinación, activación de ubiquitina ligasas, conjugación con moléculas ubiquitínicas, fosforilación de objetivos proteolíticos y activación de proteasas de la clase separina [26].

El control del ciclo celular se encuentra en el centro de muchos procesos biológicos y el descontrol en la proliferación celular conduce al cáncer. La división celular es propulsada por la oscilación de las actividades de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), las cuales, a su vez, están reguladas por la síntesis y degradación periódicas de las ciclinas, subunidades reguladoras de las CDK. La destrucción de las ciclinas mediante la vía ubiquitina-proteosoma inactiva las CDK y media la transición unidireccional de un ciclo celular al siguiente [27]. Además de las ciclinas existen también otros reguladores, tales como p27, p53, inhibidor de la anafase, Cdc20, una serie de quinasas y proteínas motoras relacionadas con la quinesina, etc., todas reguladas por la vía proteolítica de la ubiquitina proteosoma. Por tanto, el sistema ubiquitina-proteosoma controla, no sólo las actividades CDK, sino también la ejecución de muchos acontecimientos del ciclo celular más allá del circuito regulador de las CDK.

La progresión del ciclo celular está regulada por mecanismos de vigilancia o puntos de control que aseguran que la iniciación de un acontecimiento se acople con la finalización del acontecimiento anterior. Por ejemplo, una célula no puede entrar en mitosis si no ha

finalizado completamente la replicación del DNA (fase S). Así, los mecanismos de control aseguran la integridad del genoma y la fidelidad de la separación de los cromosomas mediante una ejecución ordenada de los acontecimientos. La inactivación de esos controles es la causa principal de la inestabilidad genómica (Figura 8).

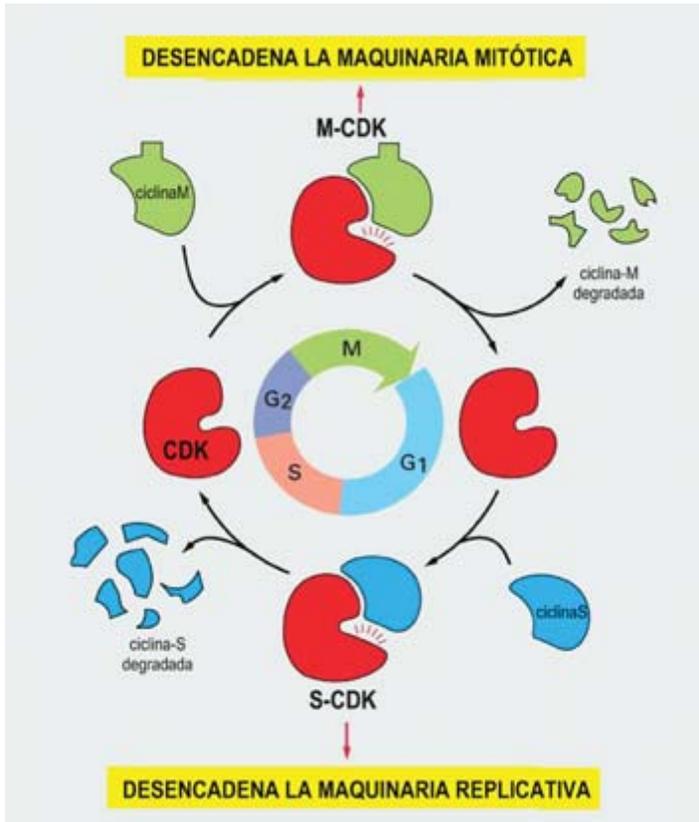


FIGURA 8. La célula usa las ciclinas y las degrada para regular las distintas fases del ciclo celular.

Existen diversos puntos de control del ciclo celular: G1/S, G2/M y M/G1. La proteólisis dependiente de ubiquitina es crítica en dos importantes etapas del ciclo celular: G1/S y M/G1. Complejos ubiquitin ligasas actúan en cada una de estas etapas por un mecanismo diferente.

La progresión G1/S requiere la acción de un complejo denominado SCF (Skp1, Culina y caja F). SCF reconoce proteínas fosforiladas en las secuencias PEST (Prolina, Glutamato/Aspartato, Serina Treonina), sitios comunes en proteínas que tienen un recambio rápido (vida media corta). La proteólisis dependiente de ubiquitina es importante para mantener la progresión del ciclo celular. El SCF poliubiquitina la ciclina D, previa fosforilación de dicha ciclina D por la misma CDK que ella activa y esta fosforilación la señala para ser ubiquitinada por SCF y posterior degradación por el proteosoma (Figura 8).

La entrada en S requiere la degradación proteolítica de un inhibidor de la fase S denominado p27. Para ello, p27 tiene que ser fosforilada en su motivo PEST por la ciclina/CDK de G1, y así puede ser poliubiquitinada por SCF y degradada por el proteosoma. Una vez eliminado el inhibidor p27, la célula puede entrar en S.

En la mitosis funcionan dos puntos de control, uno a la entrada de la mitosis G2/M y el otro en la transición metafase-anafase.

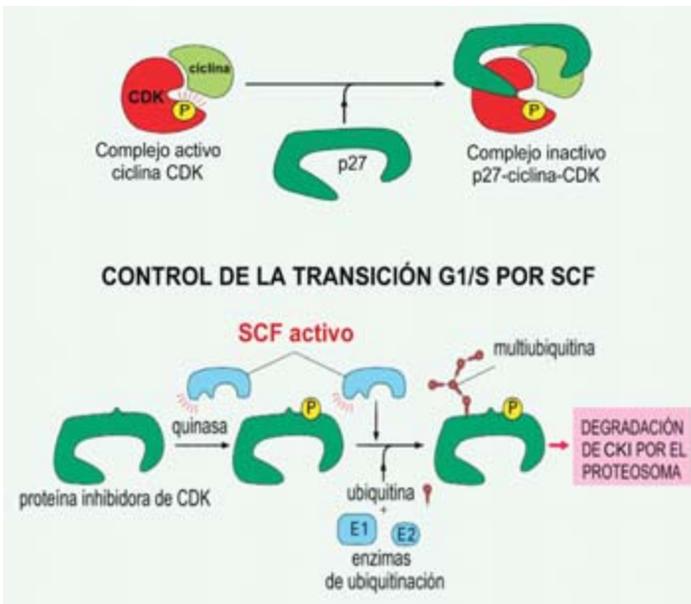


FIGURA 9. Control de la transición G1/S por el SCF, que promueve la degradación del inhibidor de las G1-CDK, la proteína p27.

La mitosis es aquella fase del ciclo celular donde la célula sufre la división celular y la citoquinesis, distribuyendo el material genético igualmente entre las dos células hijas. APC (Anaphase Promoting Complex) es una ubiquitina ligasa E3 compleja, formada por 12 subunidades proteicas. Es un importante regulador de la mitosis que controla la transición metafase-anafase, el movimiento de los cromosomas en la anafase, salida de la mitosis y acoplamiento entre las fases S y M.

El punto de control de la metafase controla la inserción del huso mitótico a los quinetocoros y la tensión generada por la inserción del huso mitótico. En presencia de un solo quinetocoro no inserto, el control de la metafase frena la separación de las cromátidas hermanas y proporciona tiempo adicional para dicha inserción. De esta manera, el control de la metafase asegura la alta fidelidad de la separación de los cromosomas y previene la aneuploidia durante la mitosis.

El punto de control de G2/M funciona cuando una célula entra en mitosis. Vigila los acontecimientos dependientes de los microtubulos, tales como la separación de los centrosomas duplicados en G2, y retrasa la transición en presencia de alteración en los microtubulos. Así, este punto de control determina la duración de la entrada en mitosis y asegura una mitosis productiva.

Ambos puntos de control de la mitosis están regulados por APC (*Anaphase Promoting Complex*), el complejo promotor de la anafase, complejo ubiquitina ligasa, antes mencionado, importante para la transición metafase/anafase durante la mitosis. APC cataliza la ubiquitinación de las ciclinas de la fase M. La regulación de APC es complicada y está parcialmente regulada por fosforilación de las subunidades de APC. La fosforilación de APC por la ciclina/CDK mitótica activa APC para ubiquitinar las ciclinas mitóticas. Su especificidad de sustrato está controlada por diferentes subunidades que forman parte del complejo. Por ejemplo, la degradación de las ciclinas mitóticas se requiere para la iniciación de la separación de los cromosomas. Más tarde, en la telofase, APC comienza a degradar proteínas implicadas en la anafase. Una subunidad que proporciona especificidad para las ciclinas mitóticas se reemplaza por otra que confiere especificidad para las proteínas de la anafase.

En la transición metafase-anafase, la cohesión de las cromátidas hermanas está mediada por las cohesinas. La disolución de tal cohesión corresponde a una cisteína endopeptidasa, la separasa, que actúa sobre la cohesina rompiendo la unión con una de sus subunidades, la Scc1, con lo que queda inactiva. La inactivación de la cohesina permite la separación de las cromátidas y la transición a la anafase. Previamente, la separasa tuvo que dissociarse de su inhibidor, la securina, la cual se degrada por la vía ubiquitina-proteosoma, utilizando la APC, previamente activada por unión con Cdc20.

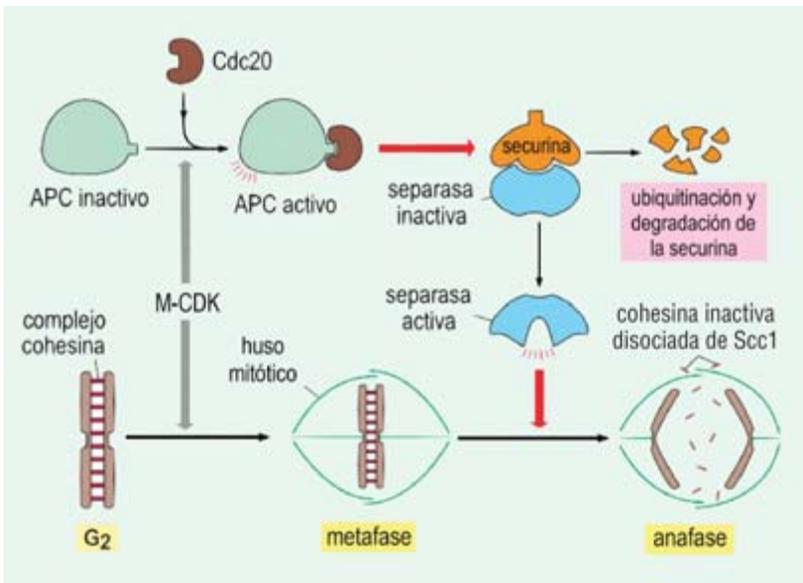


FIGURA 10. Transición metafase-anafase controlada por APC, por degradación de la securina.

De esta manera se observa que la actividad SCF se regula por modificación de los sustratos, mientras que la actividad APC se regula por modificación del complejo APC.

Estudios muy recientes han demostrado que el complejo APC, aparte de su papel en el control de la mitosis, es también importante previniendo la degradación de los sustratos del complejo SCF durante la fase G1, con la consiguiente entrada prematura en la fase S, la cual causaría inestabilidad genómica. Wei *et al.* [29] sugieren que

APC puede tener actividad supresora de tumores mediante su inhibición de Skp2, cuyas elevadas concentraciones se relacionan con la desestabilización de p27 en cánceres humanos.

Ciclo celular y E2F

En células de mamíferos, los factores de transcripción juegan un importante papel en la regulación de la progresión del ciclo celular en la transición G1/S, siendo E2F el ejemplo mejor estudiado. Entre los múltiples mecanismos de control, E2F-1 se degrada por el sistema ubiquitina-proteosoma, pero la ubiquitinación se previene si E2F se encuentra unido a la proteína retinoblastona (Rb) supresora de tumores. Como sólo la forma desfosforilada de Rb puede unirse a E2F-1 y existen muchas formas de Rb fosforiladas, la fosforilación de Rb por las CDK/ciclinas se usa como mecanismo de control. Es interesante que la degradación de E2F-1 se eleva por la oncoproteína E7 del HPV.

Apoptosis

Hasta la fecha, todos los estudios acerca de la relación entre la apoptosis y el proteosoma han insistido en el papel clave que juega el proteosoma en virtud de su capacidad para degradar moléculas reguladoras implicadas en la apoptosis. Sum *et al.* [30] han demostrado que la inducción de la apoptosis puede regular la actividad del proteosoma. Durante la apoptosis, la activación de la caspasa origina la rotura de tres subunidades específicas del complejo regulador 19S del proteosoma: Rpt5 y Rpn10, cuyas misiones son el reconocimiento de los sustratos poliubiquitinados, y Rpn2 que con Rpn1 mantienen unidas la tapa y la base del complejo 19S. Estas roturas mediadas por la caspasa inhiben la degradación proteosómica de sustratos dependientes o independientes de la ubiquitina, incluyendo moléculas proapoptóticas tales como SMAC/Diablo, facilitando así la ejecución del programa apoptótico [31-32].

Por otro lado, IAP (proteína inhibidora de las caspasas), posee un dominio RING Ubiquitina ligasa en el carboxilo terminal. XIAP está también implicada en la ubiquitinación proteica.

El proteosoma puede degradar caspasas e inhibir la apoptosis y a su vez, las caspasas pueden degradar el proteosoma con lo cual se promueve a apoptosis.

Durante la apoptosis, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases), proteína de unión al IAP (inhibitor of apoptosis protein), se libera de la mitocondria y potencia la apoptosis bloqueando la inhibición de las caspasas por el IAP. MacFarlane *et al.* [33] han demostrado que la exposición de células MCF-7 al ligando de muerte TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) originó una rápida salida de SMAC de la mitocondria, lo cual ocurre antes o en paralelo a la salida del citocromo c. La salida de SMAC se inhibe por Bcl-2/Bcl-xL o por un inhibidor pan-caspasa, lo que demuestra que este evento es dependiente de caspasas y modulado por los miembros de la familia Bcl-2. Una vez liberado SMAC, se degrada rápidamente por el proteosoma, efecto suprimido por co-tratamiento con un inhibidor del proteosoma. Como el dominio RING finger de XIAP posee actividad ubiquitin-proteína ligasa y XIAP se une estrechamente al SMAC maduro, un ensayo de ubiquitination *in vitro* reveló que XIAP funciona como una proteína ligasa E3 en la ubiquitinación de SMAC, y que el dominio RING finger de XIAP es esencial para la ubiquitinación y la rápida degradación de la SMAC liberada de la mitocondria. Así que, además de su bien caracterizada misión inhibidora de la actividad caspasa, XIAP protege las células de lesión mitocondrial accidental marcando las moléculas pro-apoptóticas para degradación proteosómica.

Proteínas del choque térmico (HSP)

Situaciones de estrés, tales como el calor, isquemia, estrés oxidativo y otros, elevan la concentración intracelular de HSP (HSP72, HSP60 y HSP27). La misión de estas proteínas es proteger las células frente a los agentes estresantes antes mencionados. Las proteínas HS funcionan principalmente como carabinas moleculares implicadas en el transporte, plegamiento, acoplamiento y degradación de proteínas lesionadas o mal plegadas. HS parece que evita que se acumulen proteínas lesionadas en células afectadas por situaciones de estrés [34].

La transcripción específica de un subgrupo de genes, tales como Hsp25 y Hsp75, se induce en condiciones de bloqueo de la actividad del proteosoma. Los inhibidores del proteosoma 26S, MG 132 y lactacistina indujeron la hiperfosforilación y la actividad de unión al DNA del factor de transcripción heat shock 1 (HSF1), que es el factor clave en la regulación de la expresión de las HSP 70 y HSP 27 [35]. Exceptuando esta expresión específica de las HSP, la inhibición del proteosoma 26S parece inhibir la síntesis proteica en general, aunque hasta la fecha no se ha propuesto ningún mecanismo e incluso hay autores que rechazan esta disminución global de la síntesis proteica [36].

Trabajos también recientes [37] han tratado de inhibir simultáneamente la actividad de la HSP90 mediante el antibiótico geldamicina y el proteosoma mediante el Bortezomid. Ambos compuestos, cuando fueron simultáneamente administrados, inhibieron la proliferación de células tumorales MCF-7 mucho más intensamente que cuando se administraron por separado. También, ambos compuestos asociados promovieron la acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas potencialmente citotóxicas, lo que indica que la ubiquitinación se encontraba incrementada. Estas observaciones, obtenidas por acción de geldamicina en combinación con el Bortezomid, apoyan la existencia de un mecanismo que interrumpe la función de la HSP90 y del proteosoma, promueve la acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas y da como resultado una actividad antitumoral elevada.

Reguladores de la transcripción

P53. P53 es un factor de transcripción de vida media relativamente corta que ejerce un efecto antiproliferativo y actúa como señal para la reparación del DNA. Originalmente se encontró que la proteína E6 del virus del papiloma humano mediaba la ubiquitinación de p53 en asociación con el factor E6-AP, el arquetipo de las proteínas E3 con dominio HECT. Frente a una lesión del DNA inducida por estrés, p53 se estabiliza transitoriamente para actuar como activador transcripcional para genes apropiados que inducen la parada del ciclo celular, y ejercer así sus funciones apoptóticas. Durante este intervalo, la concentración intracelular de p53 se eleva. Simul-

táneamente la transcripción de la oncoproteína Mdm2 se incrementa como contrapartida autoreguladora. Se ha demostrado recientemente que Mdm2 es la ubiquitina ligasa específica de p53 que marca a p53 para la degradación por el proteosoma (Figura 11). Así que el intervalo entre la estabilización de p53 y la proteólisis inducida por los elevados niveles de Mdm2, proporciona a p53 un período de tiempo para completar sus actividades reparadoras y permitir la progresión del ciclo celular. La degradación de p53 se acelera por la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV), que interacciona con E3-E6-AP, para conseguir una rápida ubiquitinación de p53. Por tanto, la infección de las células con HPV permite la proliferación celular y previene la apoptosis [38, 39].

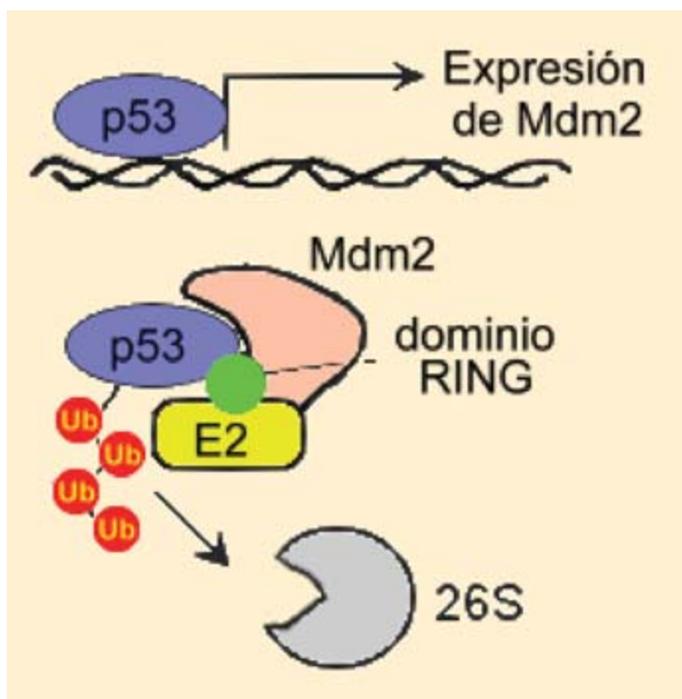


FIGURA 11. *Mecanismo de acción de p53 y Mdm2 en relación con el sistema ubiquitina/proteosoma.*

NFκB. Entre los factores de transcripción cuya actividad está modulada por el sistema ubiquitina proteosoma, se encuentra el

caso de los varios miembros de la familia de factores de transcripción inducibles Factor Nuclear κ B (NF- κ B), implicados en procesos inflamatorios, inmunes, de estrés y del desarrollo. Este factor se activa mediante un mecanismo que consta de dos etapas. Inicialmente, la proteína precursora p105 se rompe y genera la subunidad activa p50. Este es un caso particular en el cual p105 se procesa de una manera limitada en lugar de ser destruida completamente. p50 entonces se asocia con p65 para generar el activador transcripcional heterodimérico que está secuestrado inactivo en el citosol, formando un complejo heterotrimérico con el inhibidor I κ B. Después de un estímulo celular (citoquinas, componentes víricos, bacterianos o situaciones de estrés), se induce la fosforilación del inhibidor I κ B en un residuo Ser específico, lo cual conduce a la rápida ubiquitinación de dicho inhibidor y posterior degradación por el proteosoma. Al quedar libre y activo, el heterodímero (p50-p65) NF- κ B puede trasladarse al núcleo, donde inicia la transcripción específica de genes, uniéndose a los promotores o intensificadores de más de sesenta genes (Figura 12).

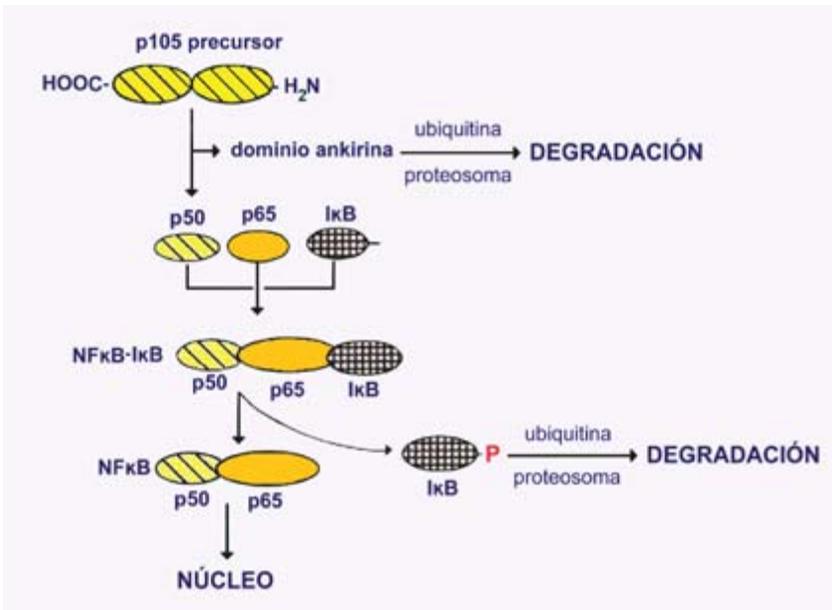


FIGURA 12. Implicación del sistema ubiquitina/proteosoma en el procesamiento del NF- κ B.

El grupo de Ciechanover ha reconstituido, tanto *in vitro* como *in vivo*, la cascada de activación del NF- κ B, han identificado las señales que protegen a p105 de la destrucción completa, y caracterizado los enzimas E2 y E3 implicados en el proceso de activación [40-42].

La activación del NF- κ B juega un importante papel en muchos aspectos del desarrollo tumoral, progresión y terapia. Algunos tipos de cáncer se caracterizan por actividad constitutiva del NF- κ B, mientras que en otros, tal actividad se induce como consecuencia de la quimioterapia. Los tumores inducidos por el NF- κ B son generalmente resistentes a la quimioterapia y su erradicación requiere la inhibición del este factor de transcripción. Amit y Ben-Neriah [43] han descrito los mecanismos de activación del NF- κ B en células normales y tumorales. El nombre, Nuclear Factor- κ B procede de su descubrimiento como factor de transcripción que se une al intensificador del gen del anticuerpo kappa de cadena ligera. Sin embargo, también activa genes que codifican para IL-1 y otras citoquinas que promueven la inflamación. Los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides se originan por su capacidad para elevar la producción de I κ B.

El NF- κ B también activa la transcripción de genes necesarios para proliferación celular, adhesión celular y angiogenesis.

Otros. Otros factores de transcripción se degradan rápidamente en células de mamíferos por la vía de la ubiquitina proteosoma, tales como c-Jun y c-Fos, pero no sus homólogos transformantes v-Jun or v-Fos. La degradación del c-Jun de mamíferos se induce por quinasas activadas por mitógenos.

El complejo factor inducible por hipoxia (HIF-1) que estimula la síntesis de la eritropoyetina se compone de dos subunidades: HIF α y HIF β . En condiciones normales, este complejo es inactivado por proteólisis del HIF α .

Enfermedad

En el sistema ubiquitin-proteosoma, una proteína sustrato sufre una modificación por la ubiquitina o por una proteína ubiquitínica. Esta modificación remodela la superficie de la proteína sustrato,

afectando entre otras propiedades, su estabilidad, interacciones con otras proteínas, actividad y localización subcelular. En muchos casos las proteínas son modificadas por muchas ubiquitinas que generan una cadena ramificada de poliubiquitina. Para la mayor parte de las proteínas, estas modificaciones de la proteína conducen a su degradación por el proteosoma 26S. Además, dependiendo del carácter de la unión entre las ubiquitinas, las modificaciones pueden conducir a la activación de reguladores de la transcripción. Modificaciones por monoubiquitinación puede marcar las proteínas para su degradación lisosómica. La conjugación de ubiquitina o proteínas ubiquitínicas puede servir también para producir una variedad de funciones no proteolíticas, tales como activación de enzimas, modulación de la dinámica de la membrana, o dirigir a las proteínas marcadas a su destino subcelular.

La ubiquitinación de las proteínas celulares es un mecanismo complejo y estrictamente controlado que selecciona de manera específica multitud de proteínas. Cualquier alteración o aberración que afecte este mecanismo tiene que influir en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como ciertas malignidades, enfermedades neurológicas y patologías de los sistemas inmune e inflamatorio [44-45].

El hecho de que estas modificaciones estén originadas por una cascada modular de enzimas con elevada especificidad hacia motivos estructurales definidos en las proteínas sustratos, hace que tengan que ser consideradas como modificaciones post-traduccionales que juegan importantes misiones en la regulación de un amplio espectro de procesos celulares: división celular, diferenciación, transducción de señales, transporte y control de calidad. No sorprende, por tanto, que las aberraciones en el sistema se hayan implicado en la patogénesis de muchas enfermedades, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y patologías de la respuesta inflamatoria e inmune, entre ellas. Así, se han encontrado relacionadas como primera causa o consecuencia secundaria, en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas transmitidas por herencia o adquiridas. Recientes hallazgos indican que este sistema está involucrado en la patogénesis de enfermedades de Alzheimer [46], Parkinson, Huntington, de los priones y la esclerosis lateral amiotrófica [47]. El conocimiento de los mecanismos que intervienen es importante para el desarrollo de nuevos medicamentos basados en estos mecanismos.

Las mutaciones en el gen de la parkina causa enfermedad de Parkinson juvenil autosómica recesiva. En casos de enfermedad de Parkinson esporádica, la parkina se acumula en los esferoides axonales y en algunos cuerpos de Lewy. Como la ubiquitina es el principal componente de los cuerpos de Lewy y los esferoides axonales, Choi *et al.* [48] decidieron investigar la relación entre la parkina y la ubiquitina. Los datos obtenidos por estos investigadores demostraron que la parkina era un sustrato de esta vía degradativa, y también que la parkina jugaba un papel en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson esporádica. Recientemente se descubrió que la parkina es una E3 ligasa, que regula por ubiquitinación proteínas del ciclo celular (como ciclina E). La mutación de la parkina lleva a la acumulación de ciclina E y esto lleva a la muerte neuronal por apoptosis [49].

Inhibición del proteosoma 26S y terapéutica

El sistema de la ubiquitina se ha convertido en una diana terapéutica interesante para el desarrollo de fármacos frente a diferentes enfermedades. Estos fármacos se dirigirían directamente a los componentes del sistema de proteólisis mediado por la ubiquitina, para prevenir la degradación de proteínas específicas. Además, esos nuevos compuestos pueden también activar el sistema para destruir las proteínas no deseadas.

Bortezomib (Velcade®)

El 13 de mayo de 2003 fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, un fármaco denominado Bortezomib (Velcade®), conocido como LDP-341, para tratar pacientes con mieloma múltiple, un cáncer de las células plasmáticas. Este fármaco bloquea la acción proteolítica del proteosoma [50], y con ello impide el efecto carcinogénico de muchas vías, entre las que cabe citar las siguientes:

1. Al impedir degradar el I κ B se bloquea la acción del factor de transcripción NF- κ B, con lo cual docenas de genes necesarios para la proliferación y adhesión de las células del mieloma no se expresan.

2. Al no degradarse las ciclinas se inhibe el funcionamiento del ciclo celular y en consecuencia la proliferación mitótica de las células cancerosas.

3. Este fármaco parece que funciona especialmente cuando se administra asociado a la quimioterapia convencional porque, probablemente, inhiba la capacidad de las células cancerosas de protegerse frente al daño que les causa la quimioterapia.

4. La inhibición de la Bcl-2 conduce a las células a la apoptosis. La angiogénesis y la metástasis se inhiben también.

5. Su administración ha de ser intermitente y su acción es reversible. Las células cancerosas mueren mientras que las normales sobreviven.

GLOSARIO

APC:	(Anaphase Promoting Complex). Factor promotor de la anaphase, también dominado cicloso. Degrada complejos ciclina-CDK fosforilados de la fase M, securina y B-ciclina.
AAA:	ATPasas Asociadas con Actividades celulares. Enzimas implicadas en procesos de transporte de membrana en los cuales se verifican movimientos entre dominios en conjunción con hidrólisis del ATP.
Cdc20:	Proteína activadora de APC.
CDK:	Quinasas dependientes de ciclinas. Unidades catalíticas del ciclo celular.
Ciclinas:	Unidades reguladoras del ciclo celular.
CP:	Unidad catalítica del proteosoma. Núcleo de 20S y 720 kDa formado por cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos, cada uno contiene siete subunidades distintas α o β y se disponen $\alpha \beta \beta \alpha$.
Culina:	Componentes principales de una serie de ubiquitina ligasas multiméricas.
E6 AP:	Factor celular de ubiquitina p53, requerido para la transformación celular del virus del papiloma mediada por E6. Arquetipo de HECT.

- HECT E3: (Homolous to E6-AP C-Terminus). Secuencia de 350 aminoácidos con una hélice N. terminal de 100 aminoácidos y una cisteína cercana al N-terminal. Sirve como adaptador para un sustrato.
- IAP: Inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos. Su actividad es inhibida por smac.
- KEKE: Dominio hidrofóbico compuesto por residuos de lisina cargados positivamente y residuos de glutamato cargados negativamente.
- MAD: Mitotic Arrest Deficiency. Inhibe APC/Cdc20, se localiza en el quinetocoro.
- Mdm2: Oncoproteína implicada en la degradación de p53.
- MHCI: Complejo de histocompatibilidad I.
- Negron: La señal que representan los aminoácidos N-terminales susceptibles.
- Parkina: E3 ubiquitina ligasa que interviene en la degradación de proteínas. La mutación del gen se relaciona con la enfermedad de Parkinson juvenil.
- PEST: Secuencias de reconocimiento para la degradación: Pro, Asp, Glu, Ser, Treo.
- RING: Finger (Really Interesting New Gene), E3s (N- end rule) incluyen ubiquitina ligasas de una sola cadena y grandes complejos APC y SCF.
- RP: Unidad reguladora del proteosoma de 19S y 720 kDa. Una en cada extremo del complejo 20S. 18-20 proteínas diferentes.
- Rpn1/Rpn2: (Regulatory proteasome non triphosphatase) (104 kDa) son componentes básicos del complejo 19S, cuya misión es el reconocimiento y eliminación de la ubiquitina de proteínas ubiquitinadas.
- Rpt 1-6: (Regulatory proteasome triphosphatase) (48 kDa cada uno). Forman un anillo hexamérico en directo contacto con el anillo alfa de siete subunidades en ambos extremos del núcleo 20S. Poseen secuencias similares a las proteínas AAA. Todos los Rpn1 se requieren para la funcionalidad del proteosoma 26S.
- SCF: (Skp1, Culin, F box), degrada complejos CDK1-ciclina fosforilados.

- Skp1: Componente de SCF.
 Skp2: Componente de SCF, miembro de la familia F box.
 SMAC: (Second mitochondria-derived activator of caspases). Inhibidor de IAP y de XIAP. Es el segundo activador mitocondrial de la caspasa. Proteína que se une y bloquea la acción inhibitoria de IAP.
 TAP: (Transporter Associated with antigen Processing), Transportador asociado con el procesado de los antígenos.
 XIAP: Proteína inhibitoria de la apoptosis ligada al cromosoma X. Posee tres dominios BIR y un motivo dedo de zinc circular.
 WW: Dominios compuestos por 30 a 40 residuos con dos triptófanos conservados, que une ligandos ricos en prolina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GOLDSTEIN, G.; SCHEID, M. S.; HAMMERLING, V.; BOYSE, E. A.; SCHLESINGER, D. H. & NIALL, H. D. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **72**, 11-15.
- (2) CIECHANOVER, A.; HOD, Y. & HERSHKO, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1100-1105.
- (3) CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A. L. & HERSHKO, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 1365-1368.
- (4) CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; KATZ-ETZION, R. & HERSHKO, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP dependent proteolytic system. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 761-765.
- (5) HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev Biochem* **67**, 425-479.
- (6) FINLEY, D.; CIECHANOVER, A. & VARSHAVSKY, A. (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**, 43-55.
- (7) PICKART, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Ann. Rev. Biochem.* **70**, 503-533.
- (8) TYERS, M. & JORGENSEN, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**: 54-64.

- (9) XIE, Y.; VARSHAVSKY, A. (2000). Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2497-2502.
- (10) GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. (2000). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- (11) HILT, W. & WOLF, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- (12) HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-409.
- (13) BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZÜHL, F. & SEEMÜLLER, E. (1998). The proteasome paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* **92**, 367-380.
- (14) PETERS, J. M.; CEJKA, Z.; HARRIS, R. J.; KLEINSCHMIDT, J. A. & BAUMEISTER, W. (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 932-937.
- (15) COUX, O.; TANAKA, K. & GOLDBERG, A. L. (1996). Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- (16) GROLL, M.; DITZEL, L.; LÖWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D. & HUBER, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature (London)* **386**, 463-471.
- (17) DAHLMANN, B.; KOPP, F.; KUEHN, L.; NIEDEL, B.; PFEIFER, G.; HEGERL, R. & BAUMEISTER, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eucaryotes to archaeobacteria *FEBS Lett.* **251**, 125-131.
- (18) GROLL, M.; HEINEMEYER, W.; JÄGER, S.; ULLRICH, T.; BOCHTLER, M.; WOLF, D. H. & HUBER, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**, 10976-10983.
- (19) LÖWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICK, P.; BAUMEISTER, W. & HUBER, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- (20) SEEMÜLLER, E.; LUPAS, A.; STOCK, D.; LÖWE, J.; HUBER, R. & BAUMEISTER, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-581.
- (21) HEINEMEYER, W.; FISCHER, M.; KRIMMER, T.; STACHON, U. & WOLF, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-25209.
- (22) FENTEANY, G.; STAENDAERT, R. F.; LANE, W. S. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino terminal threonine modification by lactacystine. *Science* **268**, 726-731.
- (23) PICKART, C. M. (2000). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* **234**, 932-937.
- (24) VARSHAVSKY, A. (1996). The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **21**, 96-102.
- (25) VARSHAVSKY, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**, 13-28.
- (26) CLARKE, D. J. (2002). Proteolysis and the cell cycle. *Cell Cycle*, **1**, 233-234.
- (27) PETERS, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* **9**, 931-943.

- (28) GLOTZER, M.; MURRAY, A. W. & KIRSCHNER, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- (29) WEI, W.; AYAD, N. G.; WAN, Y.; ZHANG, G. J.; KRISCHNER, M. W. & KAEHLIN, W. G. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell cycle phase G1 by the anaphase promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.
- (30) SUN, X. M. M.; BUTTERWORTH, M.; MACFARLANE, M.; DUBIEL, W.; CIECHANOVER, A. & COHEN, G. M. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell*. **14**, 81-93.
- (31) CASCALES, M. (2003). Bases Moleculares de la Apoptosis. *Anal Real Acad Nac Farm* **69**, 43-70.
- (32) CHEN, F.; CHANG, D.; GOH, M.; KLIBANOV, S. A. & LJUNGMAN, M. (2000). Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Differ* **11**, 239-246.
- (33) MACFARLANE, M.; MERRISON, W.; BRATTON, S. B.; COHEN, G. M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* **277**, 36611-36616.
- (34) CASCALES, M. (2002). Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas. *Real Acad Nac Farm Madrid*, pp. 72-77.
- (35) KIM, D.; KIM, S-H.; LI, G. C. (1999). Proteasome inhibitors MG-132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 264-268.
- (36) YERLICAYA, A. (2004). Cellular functions of the 26S proteasome. *Turk J Biol* **28**, 31-38.
- (37) MIMNAUGH, E. G.; XU, W.; VOS, M.; YUAN, X.; ISAACS, J. S.; BIST, K. S.; GIUS, D. & NECKERS, L. (2004). Simultaneous inhibition of hsp90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosol vacuolization and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **3**, 551-566.
- (38) MURATANI, M.; TANSEY, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 192-201.
- (39) JESENBERGER, V.; JENTSCH, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**, 112-121.
- (40) BREITSCHOPF, K.; BENGAL, E.; ZIV, T.; ADMON, A. & CIECHANOVER, A. (1998). A Novel Site for Ubiquitination: The N-Terminal Residue and Not Internal Lysines of MyoD is Essential for Conjugation and Degradation of the Protein. *EMBO J*. **17**, 5964-5973.
- (41) ORIAN, A.; GONEN, H.; BERCOVICH, B.; FAJERMAN, I.; EYTAN, E.; ISRAEL, A.; MERCURIO, F.; IWAI, K.; SCHWARTZ, A. L. & CIECHANOVER, A. (2000). SCF-(beta) (-TrCP) Ubiquitin Ligase-Mediated Processing of NF-kappaB p105 Requires Phosphorylation of its C-Terminus by IkkappaB Kinase. *EMBO J*. **19**, 2580-2591.
- (42) COHEN, S.; ORIAN, A. & CIECHANOVER, A. (2001). Processing of p105 is Inhibited by Docking of p50 Active Subunits to the Ankyrin Repeat Domain, and Inhibition is Alleviated by Signaling via the C-Terminal Phosphorylation/Ubiquitin-Ligase Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 26769-26776.

- (43) AMIT, S.; BEN-NERIAH, Y. (2003). NF-kappaB activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach. *Semin Cancer Biol* **13**, 15-28.
- (44) CIECHANOVER, A. & IWAI, K. (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* **56**, 193-201.
- (45) CIECHANOVER, A. (2003). The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem Soc Trans.* **31**, 74-81.
- (46) CASCALES, M. (1999). Oxidación y degradación de proteínas. En: Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad. *Instituto de España. Madrid*, pp. 91-123.
- (47) CIECHANOVER, A.; BRUNDIN, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. **40**, 427-446.
- (48) CHOI, P.; OSTREROVA-GOLTS, N.; SPARKMAN, D.; COCHRAN, E.; LEE, J. M.; WOLOZIN, B. (2000). Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport* **11**, 2635-2638.
- (49) MILLER, R. J.; WILSON, S. M. (2003). Neurological disease: UPS stops delivering! *Trends Pharmacol Sci.* **24**, 18-23.
- (50) ADAMS, J. (2002). Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med.* **8** (4 Suppl): S49-S54.

**Nuevos datos acerca del virus causante
de la pandemia de gripe de 1918-19
y su relación con los de la gripe aviar.
Datos recientes relativos a éstos (*)**

JOSÉ ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO
*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca*

RESUMEN

La horrible pandemia de gripe o influenza de 1918-19 (impropiamente denominada «gripe española») originó una mortandad superior a los 20 millones. El conocimiento acerca del virus causante de la misma ha avanzado notablemente en la última veintena de años, por dos motivos: 1.º El hecho de disponerse de nuevas técnicas analíticas mucho más sensibles y específicas que las precedentes, las cuales han podido ser aplicadas al estudio de muestras humanas conservadas bajo tierra a temperaturas inferiores a 0° C o después de haber sido sometidas a tratamientos fijadores y mantenidas en bloques de parafina. 2.º La aparición en los últimos años de brotes epidémicos en aves, ocasionados por virus con algunas características similares a las que se ha deducido tuvo el virus de 1918, causante de dicha pandemia.

Las mutaciones de algunos pocos aminoácidos del sitio activo de la hemaglutinina de aquél pudieron modificar la especificidad de la unión de ésta con los receptores de la célula hospedadora (constituidos por residuos terminales de ácido *N*-acetilneuramínico), adquiriendo algún virus de procedencia aviar la propiedad de unirse a células de otras especies (cerdo, seres humanos) y resultando inmune a los anticuerpos anteriormente formados. Las características (genéticas, estructurales, etc.) de la hemaglutinina y de la neuraminidasa (= sialidasa) de dicho virus

(*) Un extracto de este trabajo se expuso oralmente en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 18 de noviembre de 2004, con el título: «La gripe española de 1918 y su conexión con la gripe aviar. Avances actuales».

humano de 1918 parecen indicar su vinculación con ambos orígenes (aviar y porcino), aunque aún faltan por ser precisados algunos aspectos.

Palabras clave: Gripe (1918-19).—Gripe aviar.—Hemaglutinina.—Neuraminidasa (= sialidasa).

ABSTRACT

The horrible influenza pandemic (erroneously named «Spanish influenza») resulted in more than 20 million deaths. Knowledge about the virus that caused this pandemic has improved remarkably in about the last twenty years due to two factors: 1. The availability of new analytical techniques, more sensitive and specific than previous procedures, that have been used to study human samples maintained in permafrost or kept in formalin-fixed, paraffin-embedded blocks; 2. The occurrence in the last few years of influenza outbreaks in birds, caused by viruses with certain characteristics similar to those considered as typical of the 1918-19 influenza virus. The mutations of few aminoacids in the virus hemagglutinin active site could modify the binding specificity with receptors (*N*-acetylneuraminic acid terminal residues) of the host cell. Thus, certain avian viruses may have achieved the property of binding to cells of different species (pigs, humans) and may have become immune to previously formed antibodies. The genetic, structural, etc., characteristics of hemagglutinin and neuraminidase (= sialidase) of the 1918-19 virus seem to show their connection with both avian and porcine viruses, although some features should receive further study.

Key words: Influenza (1918-19).—Avian influenza.—Hemagglutinin.—Neuraminidase (= sialidase).

1. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios iniciados hacia 1950 y trabajos experimentales más profundos realizados desde mediados de la década de 1990 han permitido en los últimos meses avanzar notablemente en el conocimiento del virus de la famosa gripe que asoló prácticamente a todo el mundo en 1918-19, causando una cifra de muertos comprendida entre los 20 y los 40 millones: Fue la impropriadamente denominada «gripe española».

Dos motivos han influido en el renovado interés por este estudio: uno de ellos ha sido el hecho de que se ha podido disponer, desde

hace aproximadamente una veintena de años, de técnicas analíticas sensibles y específicas, de las que antes se carecía, que han podido aplicarse a muestras procedentes de víctimas de aquella pandemia, cuya conservación (por haberse mantenido a temperaturas inferiores a 0° o haberseles aplicado tratamientos previos, etc.) podría considerarse como esencialmente aceptable para estos fines. El otro motivo lo constituye la reaparición de brotes epidémicos vinculados a virus de procedencia aviaria, cuya caracterización permite deducir que se hallan estrechamente emparentados con el causante de la mencionada pandemia.

Cuestiones que han podido replantearse últimamente y empiezan a estar esclarecidas, al menos en parte, son las siguientes:

- a) *¿Por qué recibió el calificativo de «española»?*
- b) *¿Fue producida por un virus de procedencia aviaria similar a algunos que, en los últimos años, se han detectado en aves, especialmente en el pollo?*
- c) *¿Tuvo el cerdo un papel importante en esta transmisión?*
- d) *El paso de los virus desde las aves a los humanos, ¿pudo hacerse directamente o necesitó del intermediario porcino?*
- e) *¿A qué se debió la enorme patogenicidad y la extraordinaria difusión de dicha pandemia?*

Brevemente, quizá convenga resumir algunos aspectos acerca de las grandes epidemias/pandemias de gripe anteriores a la del período de 1918-19, así como algunas características de los virus causantes de los brotes epidémicos recientes en relación con ella.

1.1. Denominaciones y antecedentes históricos

El nombre de influenza parece ser que se usó en la ciudad de Florencia ya en el siglo xiv —concretamente por Villani en 1358—, por considerar que la enfermedad en cuestión era debida a la «*influenza di freddo*» o «*di stelle*» (1, 2); es decir, al frío —factor que, sin duda, favorece su aparición (aun cuando también se padece en climas tropicales)—, o a las estrellas (aspecto este atribuible a las arrai-

gadas teorías astrológicas vigentes en aquellos años, e incluso en épocas muy posteriores).

Ya en 1742, Sauvage habló de la «grippe». Los términos «*gripper*» (francés), «*to grip*» (inglés) o «*greifen*» (alemán) significan «agarrar, atrapar». Quizá la forma brusca de presentarse en muchas ocasiones esta enfermedad haya justificado tal nombre, que en español se escribía «*grippe*» hasta el año 1925 como mínimo, y luego con una sola pe.

Por otro lado, aunque actualmente las palabras *influenza* y *gripe* son sinónimas, en manuales de Patología Médica del año 1947 aún se reservaba el nombre de influenza sólo para la forma de tipo pandémico (3). Otras denominaciones, de carácter vulgar, como «trancazo» y, anteriormente, «el soldado de Nápoles» (por la coincidencia de su aparición en el tiempo con la divulgación de este número musical de una zarzuela) también han sido de uso corriente.

Descripciones de epidemias/pandemias que muy probablemente fueron de gripe, a juzgar por las síntomas con que aparecen descritas (generalmente con mayor claridad y detalle a medida que son menos lejanas), son las indicadas, remotamente por Hipócrates, y desde el Renacimiento en los años: 1510, 1580, 1675, 1693, 1729-1733, 1742-1743, 1762, 1768, 1789-1790, 1799-1800, 1803, 1830, 1836-1837 y 1889-1890 (1).

De dichas descripciones, se deduce que, *en general, tales epidemias/pandemias tienen en común el haber sido originarias de países lejanos de Oriente (China), pasando por Rusia, etc., antes de llegar a Europa Occidental.*

En lo referente a las de los años 1889-1890 y 1918-1919 en Madrid y Salamanca, se dispone de una monografía vinculada a esta Real Academia Nacional de Farmacia (2). En lo relativo a las de los años 1957 y 1968, datos tanto epidemiológicos como acerca de la composición de los virus causantes de ellas se hallan en una publicación fácilmente accesible (4), además de en obras de la especialidad. Y en lo concerniente a los brotes epidémicos recientes de origen aviario, algunas monografías actuales recogen sus aspectos esenciales (1, 5, 6).

Es curioso observar que, a diferencia del «aprovechamiento literario» de temas vinculados a epidemias como las de peste («Il

Decamerone», de Bocaccio; «La peste», de Camus), o las de fiebre amarilla («The narrative of Arthur Gordon Pym», de Poe), *tanto episodios de las epidemias de gripe del siglo XIX como de la pandemia de 1918-19 no han sido apenas objeto de descripciones noveladas o realistas por parte de los escritores; y ello, lo mismo en España que en el extranjero.*

¿Pudo ser la coincidencia en el tiempo —meses finales y terminación— de la terrible guerra mundial primera con las etapas de mayor mortandad de dicha pandemia lo que contribuyó al deseo de no insistir más en la evocación de tantos padecimientos, y así favorecer un deliberado olvido?

1.2. Datos relativos a la gripe de 1918-19 recogidos en la Enciclopedia Espasa

Dado el prestigio del que ha venido gozando en el mundo español e hispanoamericano la famosa Enciclopedia Espasa, el examen de lo en ella recogido en relación con la pandemia de 1918-19 puede ser un criterio útil para interpretar cómo se fue aceptando (en la cultura general española), primeramente el origen vírico de la enfermedad y después la adecuación de los posibles remedios para combatirla, sin perder de vista el aspecto de la injustificada y desafortunada denominación de «gripe española», con la que se la ha venido conociendo, sobre todo fuera de España.

Solamente un breve comentario acerca de estas cuestiones es lo que se intenta resumir a continuación:

- En el año 1925 (tomo XXVI, págs. 1348-50), aparecen descritos por primera vez en esta obra los signos clínicos y formas de la «grippe», y se incluye un mapa con indicación de los numerosos países que la sufrieron en 1918.
- En el suplemento del año 1931 (ocupando sólo la mitad de la pág. 1192), además de los datos de tipo clínico de la gripe (ya escrita con una sola pe), se señala el uso del llamado «nucleinato sódico» en inyecciones para su remedio.
- Por otro lado, ni en la publicación de 1925 ni en la de 1931 —ni en las de años siguientes— se menciona a esta gripe

como «gripe española». Y en el intervalo comprendido entre 1931-1941, no figura ninguna reseña sobre ella en los suplementos correspondientes a los años 1934, 1936-39 y 1940-41.

- En el período de 1942-44 (pág. 921), en el escaso espacio de 1/4 página, se indica por primera vez que: «Andrews admite en su etiología un virus básico y una serie de exaltaciones y mutaciones» (recuérdese que el origen vírico de esta enfermedad quedó demostrado ya en 1931, para el cerdo, y en 1933 para los humanos). En cuanto al tratamiento, se advierte que «los sueros y vacunas inspirados en las asociaciones bacterianas están hoy abandonados»; y que «se prescribe la estricnina, las inhalaciones de oxígeno, los arsenicales, salicilatos y la sangría»...
- Pero el origen vírico, como único responsable de la enfermedad, no sería del todo admitido hasta 1945-48, aunque confusamente, cuando en su página 1292 (ocupando modestamente la reseña sólo 1/5 de la página) se lee: «Gripe. Producida por un virus al que se unen las acciones de bacterias que son las que determinan el genio patógeno de la afección y la razón de las complicaciones; de ahí el valor terapéutico de las sulfamidas y la penicilina».
- Hay que llegar al tomo correspondiente a los años 1949-52 para que, en el breve espacio de 1/6 de la página 1190, se indiquen la forma y dimensiones de los tipos A y B y hasta se mencione al tipo C del virus de la gripe. También, en contra de lo recogido en 1945-48, se señala que «las vacunas sólo crean inmunidad frente a las epidemias originadas por el tipo de virus inyectado»; y que «todos los antibióticos han fracasado en el tratamiento».
- A diferencia del suplemento de 1953-54, en que nada se incluye acerca de la gripe, en el de 1955-56 (págs. 477-478) se utilizan los datos de una revisión hecha por G. Cateigne, que es una adecuada síntesis del estado de la cuestión, incorporando el dato de la existencia en el virus de la enzima RDE (= «Receptor Destroying Enzyme»), que es la actualmente conocida como sialidasa o neuraminidasa. Asimismo,

se resumen los «resultados satisfactorios» producidos por la vacunación, aunque se estima que la vacuna «resulta muy costosa».

- Nada se publica en el suplemento de 1957-58 en relación con la gripe; y en el de 1959-60, en las diez líneas de su página 770, únicamente se indica que virus atenuados se emplean como vacuna en la URSS.
- En los suplementos bienales del amplio período comprendido entre 1961-62 y 1997-98 nada aparece acerca de la gripe, a pesar de que en ese intervalo hubo una pandemia tan importante como la de 1968 (tampoco anteriormente se había mencionado la de 1957).
- Ya en 1999-2000, en la página 1022, se recomienda la vacunación y se comentan los aspectos esenciales del nuevo fármaco antigripal Oseltamivir, aunque nada se dice de su análogo denominado Zanamivir.
- Finalmente, en el tomo correspondiente a 2001-2002, que es el último publicado, nada se incluye acerca de la gripe.

De la lectura de los párrafos anteriores, se podría deducir que: a) *escaseó en España información generalizada* —tomando como fuente a dicha enciclopedia— *acerca de la gripe, entre 1918 y 1955, como mínimo*; b) *con notable lentitud se fue abriendo camino la teoría del origen vírico de esta enfermedad*; c) *pueden considerarse como empíricos e inadecuados los remedios preconizados para combatirla, hasta épocas no tan lejanas como el año 1949*; d) *ni una sola vez se refieren los autores de las reseñas de dichos años (1925-2000) a ella como «gripe española»*. Cabe preguntarse, en relación con este último punto: ¿Por qué se la ha denominado así por los autores extranjeros? En el apartado siguiente se resumen algunas interpretaciones al respecto.

2. ¿POR QUÉ SE DENOMINÓ «GRIPE ESPAÑOLA» A LA PANDEMIA DE 1918-19, Y TODAVÍA SE LA SIGUE ASÍ LLAMANDO POR ALGUNOS AUTORES?

Aun con las limitaciones antes apuntadas, acertadamente la Enciclopedia Espasa nunca ha utilizado la desafortunada denominación de «gripe española» para referirse a la pandemia gripal de 1918-19.

Tampoco, en una enciclopedia reciente (de 1998) como es la de «Microsoft® Encarta® 99» se habla de «gripe española» en la página dedicada a este tema.

Además de una interesante reseña sobre la gripe en general, con toda precisión sí se señala en la «Gran Enciclopedia de España» (en el tomo 10 del año 1994, pág. 4835), que «aunque es denominada “gripe española”, se originó en China, de donde pasó a Filipinas y a EE.UU. [y] posteriormente se extendió a Europa». También allí se indica que fueron los soldados estadounidenses que combatieron en la I Guerra Mundial «uno de los principales canales de difusión».

Ahora bien, el especialista norteamericano R. G. Webster (7) recoge en su publicación del año 2001 el dato de J. S. Oxford, según el cual: «los archivos médicos militares (mantenidos largo tiempo en secreto) revelan que hubo un gran número de muertos de infección respiratoria en los campos bélicos de Francia en 1916»; y recuerda que los EE.UU. no entraron en guerra hasta abril de 1917...

Otras hipótesis son las siguientes: «Habiéndose detectado durante la primavera de 1918 los primeros casos de gripe entre los soldados ingleses que se hallaban en Francia, cerca de Rouen (Normandía), la enfermedad se propagó pronto a otros países vecinos (Inglaterra, Italia, España) y a otros más lejanos (EE.UU.) como consecuencia de los desplazamientos de las tropas. [...] Parece ser que los periodistas franceses la habían llamado inicialmente «gripe americana»; pero la circunstancia de ser los soldados norteamericanos sus aliados en el conflicto bélico aconsejaba no asignarles tal vinculación; y existiendo también casos de gripe en España, se optó por generalizar el uso de esta expresión, que más tarde fue asumido por alemanes y otros» (2).

Cabe, asimismo, la posibilidad de que la enfermedad se hubiera extendido a partir de más de un punto de origen.

El especialista francés C. Hannoun (8) acepta la idea de que «la llegada regular de trabajadores chinos a África y a Europa, a lo largo de aquellos años, podría haber sido el origen de una introducción anterior» [a la coincidente con la guerra]. Y muy verosímil resulta su interpretación de que la circunstancia de que la Familia Real española y los ministros españoles padecieran la gripe, hacia el mes de mayo de 1918, pudo contribuir a esta injustificada denominación; aunque dicha «enfermedad ciertamente no comenzó en España» (8), ni aquí fue donde produjo relativamente más víctimas, a pesar de que muchísimas familias perdieron a alguno de sus componentes, generalmente entre los jóvenes, calculándose que hubo unos 300.000 muertos como mínimo.

Es sabido que la propagación del virus se facilitó por los transportes de tropas, tanto marítimos como terrestres. En este caso, se detectaron focos en zonas contiguas a las estaciones ferroviarias, concretamente en las de la línea que desde Irún llevaba de regreso soldados portugueses a su país, atravesando el territorio español.

Por último, aunque todavía en algunas revistas prestigiosas extranjeras se habla en el año 2000 y siguientes de la «“Spanish” influenza», son muchos los autores que evitan tal denominación y acertadamente se refieren a ella como la «pandemia de gripe de 1918-19».

3. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS, ESPECIALMENTE DE LA HEMAGLUTININA Y LA SIALIDASA DEL VIRUS DE LA GRIPE, EN RELACIÓN CON EL OBJETO DE ESTE ESTUDIO

Para mejor comprender lo que se expondrá en los apartados siguientes, se considera aconsejable resumir algunos datos relativos a estas dos glicoproteínas existentes en la envoltura del virus de la gripe (tipos A y B), así como mencionar a otros componentes de dicho virus.

La hemaglutinina, HA, es una glicoproteína de forma alargada constituida por un trímero, cada uno de cuyos monómeros termina en una parte redondeada. Se halla repartida uniformemente en la cubierta vírica, a diferencia de la distribución irregular (arracimada) en que lo está la sialidasa. Su estructura tridimensional fue determinada por Wiley, Skehel y Wilson en 1981, siendo ésta una valiosa información que ha facilitado el conocimiento de las interacciones virus-célula hospedadora que aseguran la introducción del virus en la célula (2, 6). «Cada monómero es procedente de un precursor de 550 aminoácidos, que es escindido después de su inserción en la membrana del retículo endoplasmático, formándose los componentes HA₁ y HA₂, que están unidos entre sí por un enlace —S—S—. Cada monómero tiene un vástago o pedúnculo alargado y una cabeza globular. [...] El virus entra en la célula mediante la unión de la hemaglutinina trimérica con las moléculas receptoras que contienen ácido siálico en la superficie celular. La molécula de hemaglutinina lleva en su superficie cuatro epitopos (determinantes antigénicos) separados. Sin embargo, el sitio del enlace con el ácido siálico, localizado en una depresión de la superficie molecular, es una invariante. El virus así unido es llevado a los endosomas celulares, siendo transferido el complejo vírico transcriptasa-ácido nucléico desde los endosomas al citoplasma, y de aquí al núcleo, donde el ARN es replicado y transcrito. La fusión del virus con las membranas celulares es mediada por la hemaglutinina en las condiciones de acidez de los endosomas» (9).

Como se detalla en el apartado siguiente, «*se requiere solamente una pequeña distorsión estructural de la molécula de hemaglutinina, modificación asociada con la sustitución de un aminoácido, para producir un cambio antigénico que permite al virus escapar de la neutralización por un anticuerpo monoclonal. [...] Otro importante hallazgo es el de la influencia de la fracción glucídica de la molécula de la hemaglutinina en la modulación de la actividad antigénica*» (10). *Glucosamina, manosa, galactosa y fucosa son los cuatro monosacáridos componentes de dicha fracción tanto en la hemaglutinina como en la sialidasa, constituyendo el 16-24 por 100 de la primera y el 46 por 100 de la segunda. De los 15 subtipos conocidos de hemaglutinina, HA, abreviadamente denominados con una H, sólo tres se han hallado en la especie humana.*

La sialidasa (impropiamente llamada asimismo neuraminidasa), NA, es también una glicoproteína, pero con actividad enzimática (EC 3.2.1.18) de tipo hidrolítico. *Se conocen nueve subtipos de esta enzima en dicho virus, aunque sólo dos se han encontrado en los humanos, indicados como N1 y N2* (6).

La estructura tridimensional de la N2 se estableció en 1983 por Varghese, Laver y Colman. Se halla formada por 469 aminoácidos (2). Es un homotetrámero (formado por subunidades de M_r 60.000) que se sabe *contribuye a la liberación de los recién formados viriones, evitando la aglomeración y retención de éstos en la superficie de la dañada célula hospedadora*. Para su actividad se requiere dicha estructura tetramérica. «Aunque las sialidasas de cepas diferentes de virus tipos A y B son distinguibles antigénicamente, su sitio activo es una invariante en todas las cepas hasta ahora caracterizadas» (9).

Otros datos acerca de la sialidasa y de la *O*-acetilesterasa (EC 3.1.1.53), ésta propia del tipo C del virus de la gripe y no del A ni del B, pueden hallarse en publicaciones fácilmente accesibles (2, 4, 6, 11-14). (En el tipo C existe una proteína peculiar, la HEF, con actividades hemaglutinante, esterásica y de fusión.)

En los tipos A y B, además de la sialidasa y de la hemaglutinina, «otros componentes de la envoltura vírica son la bicapa lipídica (procedente de la célula hospedadora), y las proteínas M (que integran la matriz de dicha envoltura), siendo la actividad de la M2 la de *facilitar el paso de los protones acidificando el medio*. En el interior se hallan las proteínas no estructurales NS1 y NS2, así como las nucleoproteínas NP y el ARN; éste, precisamente de polaridad negativa, en forma de ocho segmentos (en los tipos A y B, y siete en el tipo C). También hay tres polimerasas (la PA, ácida, la PB, básica y la PB2). [...] Son la nucleocápsida (formada por las nucleoproteínas NP y el ARN, al que envuelven helicoidalmente) y la proteína M, antígenos internos que permiten distinguir los tres tipos de virus de la gripe: A, B y C. Pero son los antígenos de su superficie (hemaglutinina y sialidasa = neuraminidasa) los que definen los subtipos propios del A y no distinguibles en el B ni el C» (2, 6).

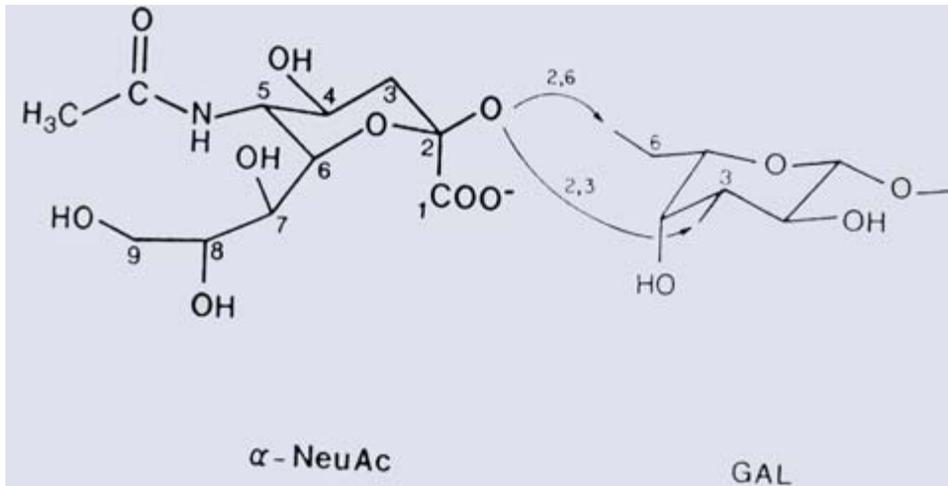
4. REPERCUSIÓN DE CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA GRIPE EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ÉSTE EN MAMÍFEROS Y EN AVES

Desde que en la década de 1980 se estableció la estructura tridimensional de esta glicoproteína, se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las relaciones estructura-función propias de la misma. Además, se ha logrado valiosa información sobre otros aspectos vinculados a ella, concernientes tanto a virus de procedencia humana como aviar.

En 1984, Naeve *et al.* dedujeron que «*virus recombinantes de gripe aviar conteniendo hemaglutinina de virus de gripe humana [tipo A] no se replican en patos. [Pero] dos mutaciones en el sitio receptor de la hemaglutinina [del virus de la gripe] humana, en los residuos [de los aminoácidos números] 226 y 228 permiten la replicación en los patos. Estas mutaciones tienen como resultado una secuencia del sitio de enlace del receptor idéntica a las secuencias conocidas del virus de gripe aviar*» (15).

¿Qué aminoácidos son el número 226 y el número 228? ¿Qué aminoácidos resultan de estas mutaciones? ¿Con qué ácido(s) siálico(s) se realiza la unión? ¿Cuál es el tipo de unión del ácido siálico con el monosacárido contiguo en su secuencia?

He aquí las contestaciones: *El aminoácido número 226, que es la leucina, muta a glutamina; el número 228, que es la serina, muta a glicocola. El ácido siálico implicado es precisamente (entre la cuarentena larga de ácidos siálicos conocidos) el N-acetilneuramínico (α -NeuAc); el cual tiene a la galactosa (GAL) como monosacárido contiguo en la secuencia estructural oligosacarídica. Ahora bien, así como las moléculas de hemaglutinina conteniendo leucina reconocen las uniones α 2, 6 del ácido N-acetilneuramínico con la galactosa de los glicoconjugados implicados, las moléculas de hemaglutinina que llevan glutamina en dicha posición 226 (como resultado de la mutación producida) reconocen la estructura ácido N-acetilneuramínico α 2, 3 galactosa (no a la α 2, 6). Véase el esquema siguiente:*



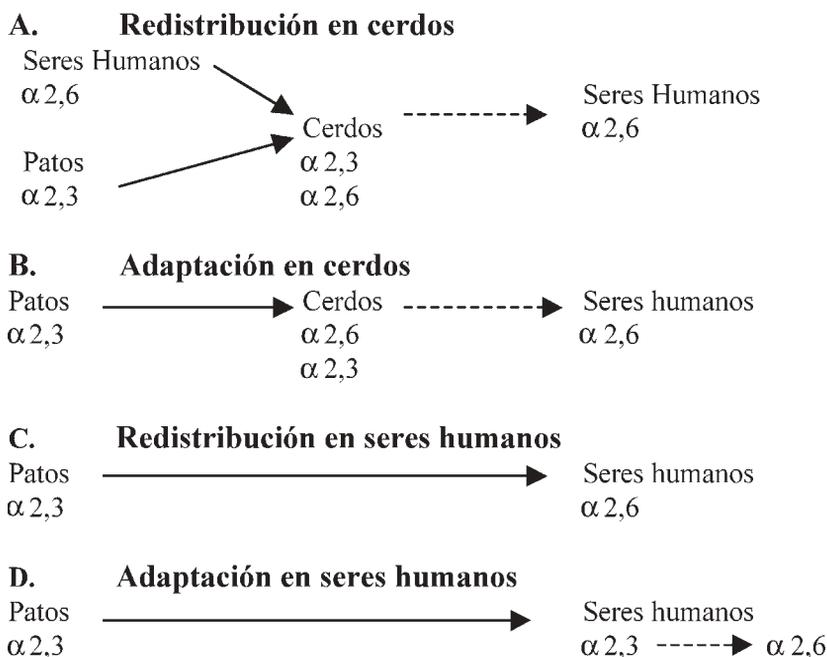
Se estima que estas mutaciones alteran la conformación de la hemaglutinina y su antigenicidad, evitando el bloqueo por anticuerpos. Los cambios de leucina a glutamina y de serina a glicocola permitirían al virus atravesar el tracto digestivo de los patos (caracterizado por su fortísima acidez) y realizar su replicación, etc. Se cambia, por tanto, el neumotropismo del virus de la gripe humana por un enterotropismo típico del virus de las aves.

Los resultados de Naeve *et al.*, antes comentados, han sido confirmados por otros autores. Sauter *et al.*, en 1989, han averiguado, mediante la técnica de resonancia magnética nuclear, que «el ácido siálico es el único componente que contacta con la proteína; [y que] la hemaglutinina que sufre cambio conformacional inducido a pH bajo mantiene su capacidad para unirse al ácido siálico» (16).

En 1998, Ito y cols. (entre ellos el mencionado Webster) corroboran que «aunque los virus tipo A de la gripe reconocen uniformemente oligosacáridos de la superficie celular con ácido siálico terminal, su especificidad respecto al receptor varía. La mayor parte de los virus de gripe aviar se unen *preferentemente* a N-acetilneuramínico- α 2,3 galactosa (NeuAc α 2,3 Gal) de los oligosacáridos, mientras los virus de la gripe humana *prefieren* los del enlace NeuAc α 2,6 Gal» (17). El aporte principal de estos autores ha sido demostrar, además, que *el cerdo puede servir como «crisol» para generación de recombinantes de virus de gripe humana-aviar. ¿Cómo?:* Mediante la

posibilidad de actuar de receptor para ambos tipos de enlace (α 2,3 y α 2,6) en células de su tráquea (mientras en la tráquea humana sólo sería esto factible para los α 2,6).

Los siguientes **modelos de generación de cepas** (que pudieron ocasionar las pandemias de gripe del siglo xx: la de 1918-19, la asiática de 1957, la de Hong Kong de 1968 y, la más leve, de Rusia de 1977), podrían ser (17):



Asimismo, dichos autores señalan que «la generación de cepas pandémicas de virus tipo A de gripe es un proceso complejo que requiere combinaciones críticas de genes aviáres y humanos o mutaciones que afectan a la molécula de la hemaglutinina» (17).

También en 1998, Weis y cols. (entre ellos Skehel y Wiley) (18) han determinado, mediante técnicas de rayos X, la estructura de un mutante del receptor que se enlaza a la hemaglutinina en comparación con la estructura de la forma no mutada; y, además, ambas estructuras formando complejos con el trisacárido sialil-lactosa (que es un análogo estructural del receptor normal). Sus resultados

muestran que los ácidos siálicos se unen a los aminoácidos tirosina (n.º 98) y triptófano (n.º 153) que, con otros aminoácidos, forman una depresión o pequeña cavidad bien conservada que actúa como receptor del virus.

En una revisión del año 2000, Skehel y Wiley (19) dan a conocer resultados relativos al enlace con la hemaglutinina y a la fusión que permite la entrada del virus en la célula. Mediante la técnica de rayos X (resolución de 3 Å) determinan las estructuras: del precursor HA₀ (escrito también como HAO), de la conformación metaestable a pH neutro encontrada sobre el virus, y de la conformación inducida por el pH en la fusión. Detallan la estructura y orientación del complejo formado y deducen, por ejemplo, que la serina número 136, formando un puente de hidrógeno, se enlaza con el grupo carboxilato del ácido siálico; la tirosina 98, con el grupo hidróxilo de dicho ácido; la leucina 194, mediante fuerzas de Van der Waals, con el grupo hidroxilo-7, etc. Otros estudios, efectuados mediante resonancia magnética nuclear, son concordantes con éstos.

De acuerdo con los datos ya establecidos sobre especificidad, proponen estos autores que «en los primeros años de las pandemias de gripe asiática [1957] y de Hong Kong [1968], que probablemente fueron causadas por la introducción de virus conteniendo hemaglutininas aviarias en la población humana, se identificaron virus con especificidad de reconocimiento tanto α 2,6 como α 2,3; lo cual sugeriría un cambio gradual en la especificidad» (19).

Respecto a la variación antigénica, «los anticuerpos antihemaglutinina neutralizan la capacidad de infección del virus. Como consecuencia, se requieren cambios en la estructura de la hemaglutinina (que impidan la unión con el anticuerpo) para la generación de virus con el potencial suficiente para causar nuevas epidemias. [...] Las sustituciones [de aminoácidos] que son mantenidas pueden haber sido seleccionadas para impedir el reconocimiento por los anticuerpos. [...] [A su vez], *el componente oligosacárido aporta dos mecanismos para evadir la respuesta inmune, siendo ambos observables en la hemaglutinina*: El primero corresponde a las porciones de la superficie de la hemaglutinina cubiertas por las cadenas laterales glucídicas, que son sintetizadas por las enzimas celulares y, por ello, «autoantigénicas» y no inductoras de anticuerpos; el segundo [es el

de] las sustituciones de aminoácidos, durante la deriva antigénica, que pueden crear nuevos sitios de engarce para oligosacáridos en las regiones de unión con los anticuerpos, generando resistencia a la unión con anticuerpos. [...] [Por otro lado], bajos valores de pH y altas temperaturas pueden disparar la actividad de fusión» (19). Finalmente, tanto la proteína HEF (con actividad hemaglutinante, esterásica y de fusión), propia del tipo C del virus de la gripe, como la hemaglutinina del tipo A, pueden haber sido ensambladas a partir de dominios preformados y, tal vez, son vestigios «de una estructura de una proteína de membrana ancestral» (19).

En el año 2000, Matrosovich *et al.* (20) han publicado sus resultados acerca de las alteraciones más tempranas que se producen en las propiedades del receptor de mamíferos en cuanto a la unión con la hemaglutinina de virus de gripe de patos salvajes.

Partiendo de lo ya establecido por otros autores en cuanto a que las «cepas de virus tipos A y B de gripe humana y de cerdo se unen preferentemente con receptores que contienen residuos terminales de 6'sialil(N-acetil-lactosamina) (Neu5Ac α 2-6 Gal β 1-4GlcNAc) mientras que los virus aviares y equinos lo hacen escasamente con este oligosacárido y lo realizan preferentemente con 3'sialilgalactosa (Neu5Ac α 2-3 Gal)» (20), averiguan que «las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 190 [ácido glutámico] y 225 [glicocola] en la secuencia [de la hemaglutinina] del virus aviar están también presentes en la hemaglutinina H1 de los virus humanos, incluyendo los virus que circularon en 1918, sugiriendo que las sustituciones en estas posiciones son importantes en la generación de cepas [conteniendo hemaglutininas] H1 humanas causantes de pandemias. Estos resultados muestran que la especificidad de unión con el receptor de la hemaglutinina es tempranamente alterada después de la transmisión del virus a humanos y cerdos y, por ello, puede ser un requisito previo para una replicación altamente eficaz y la difusión que caracteriza las cepas epidémicas» (20).

Finalmente, en 2002, Ha y Stevens (en colaboración con los ya citados Skehel y Wiley) recuerdan que hay 15 subtipos de la gripe A por la índole de la hemaglutinina (H1-H15), «todos los cuales se encuentran en especies de aves. Tres causaron pandemias en el siglo pasado: H1 en 1918 (y en 1977), H2 en 1957 y H3 en 1968. En 1997 un H5, y en 1999

un H9, causaron brotes de enfermedad respiratoria en Hong Kong» (20). Habiendo determinado estos investigadores las estructuras tridimensionales de la hemaglutinina H5 aviar (de pato) y de la H9 de cerdo [...] y comparado con la H3 que causó la pandemia de 1968 y con la HEF del virus de la gripe tipo C, «las comparaciones de la estructura y la secuencia sugieren que los subtipos de hemaglutinina pueden haberse originado por diversificación de las propiedades que afectan la metaestabilidad de las hemaglutininas, requerida para sus actividades de fusión con la membrana y la infección vírica» (21).

5. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA HEMAGLUTININA, DE LA SIALIDASA (= NEURAMINIDASA) Y DE OTROS COMPONENTES VÍRICOS EN RELACIÓN CON LA PANDEMIA DE 1918-19

Con posterioridad al año 1950, un nuevo enfoque se ha intentado aplicar al esclarecimiento de las peculiaridades del virus de la gripe que produjo la pandemia de 1918-19. Probablemente uno de esos primeros intentos fue el de E. Murray, F. Davenport y M. Hilleman (22), quienes en septiembre de 1950 se desplazaron hasta Nome, en Alaska (EE.UU.), con la intención de extraer muestras (previo acuerdo con los esquimales allí residentes) de personas fallecidas en 1918 y enterradas en sitios mantenidos a muy bajas temperaturas. Sin embargo, la circunstancia de no poderse garantizar el haberse mantenido de modo constante tales temperaturas por debajo de 0° impidió obtener resultados válidos.

Tampoco pudo J. Hultin (de la norteamericana Universidad de Iowa), en 1951, averiguar datos de interés en Alaska igualmente, aunque repetiría su intento en años posteriores, cuando se disponía de técnicas analíticas más perfeccionadas.

Ya en la década de 1990, la doctora K. Duncan, de la Universidad de Windsor (en Ontario, Canadá), intentó investigar en los cadáveres de 11 mineros (de hulla) fallecidos por aquella gripe en la isla de Spitsberg (en Noruega), cerca del polo norte, los cuales se habían contagiado en el barco que los transportaba. Pero sus resultados, parece ser, no han sido publicados.

En 1997, Taubenberger *et al.* aplicaron con éxito las técnicas de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa a muestras de tejido pulmonar que habían sido fijadas por el formol y conservadas en bloques de parafina, en Washington, en un hospital militar. «*Nueve fragmentos de ARN vírico fueron secuenciados de las regiones que codifican la hemaglutinina, la sialidasa, nucleoproteínas, proteína matriz 1, y proteína matriz 2. Las secuencias son congruentes con un nuevo virus de gripe H1N1 que pertenece al subgrupo de cepas que infectan a humanos y cerdos, no al subgrupo aviar*» (23).

Otros aspectos importantes se indican en este artículo: *a)* Que la cepa H1N1 pudo proceder de un reservorio existente en aves acuáticas salvajes, surgido antes de 1918. *b)* Que la secuencia de la hemaglutinina aparece como estructuralmente relacionada con las cepas primitivas de gripe de cerdo, corroborándose así datos serológicos de los años 1930. *c)* «*Los análisis filogenéticos de todos los genes de los virus de la gripe apuntan firmemente hacia un antepasado común para los linajes (humano y porcino) de virus H1N1*» (23).

En febrero de 1999, los antes citados Taubenberger, Reid y Fanning (en colaboración en este trabajo con Hultin, también ya mencionado) (24), confirmaron y ampliaron resultados anteriores. En esta ocasión estudiaron muestras de dos procedencias: de un hospital militar de Washington, los tejidos pulmonares de dos varones, uno de veintiún y otro de treinta años, ambos fallecidos a causa de la gripe en septiembre de 1918; y de víctimas de dicha enfermedad enterradas en una fosa de Brevig Mission (Alaska) y mantenidas en tierra helada permanentemente («permafrost») desde 1918.

Determinaron la *secuencia completa del gen de la hemaglutinina del virus de la gripe de 1918* y dedujeron que *dicho gen, «aunque más estrechamente relacionado con la secuencia de cepas aviares que el de otros mamíferos, es de mamíferos y puede haber ido adaptándose a los humanos antes de 1918»* (25).

De todos modos, igualmente en febrero de 1999, en opinión del también prestigioso especialista norteamericano R. G. Webster (25), y como comentario al trabajo de Taubenberger *et al.* (24), los secretos sobre el origen y peculiaridades del virus de la gripe de 1918 aún

«permanecían huidizos». No obstante, Webster concluía su publicación diciendo que «se puede esperar que estudios futuros de heces de aves y tejidos animales procedentes de tierra helada contribuirán a desvelar [tales] secretos» (25).

Otro avance decisivo en estos estudios se lograba, en el año 2000, gracias al trabajo de Reid, Fanning, Janczewski y Taubenberger (26), al caracterizar *el gen de la* otra glicoproteína de la superficie del virus de la gripe de 1918: la *neuraminidasa* (o, más exactamente denominada, *sialidasa*, enzima EC 3.2.1.18). Así, prosiguiendo sus investigaciones anteriores, los análisis de muestras de la misma procedencia que la indicada por ellos en 1999, les permitieron deducir que «*la neuraminidasa de 1918 comparte muchas características de secuencia y estructurales con las cepas aviarias*, incluyendo el sitio activo conservado, la longitud del pedúnculo [de la molécula de neuraminidasa] del virus tipo salvaje, sitios de glicosilación, y sitios antigénicos. *Filogenéticamente, el gen de la neuraminidasa de 1918 parece ser intermedio entre mamíferos y aves*, sugiriendo que fue introducido en los mamíferos justo antes de la pandemia de 1918» (26). *La gravedad de la pandemia de 1918-19 en comparación con otras, como la de 1957 (en que hubo también reemplazamiento tanto de hemaglutinina como de neuraminidasa), o la de 1968 (en que sólo hubo sustitución de hemaglutinina), podría explicarse, según estos autores, porque «hemaglutinina y neuraminidasa fueron antigénicamente nuevas, y a que el virus no había circulado ampliamente entre la población humana antes de la primavera de 1918»* (26).

A su vez, una «inhabitual función de la neuraminidasa» sería, en opinión de Goto y Kawaoka (27), la de unirse al plasminógeno y secuestrarlo, lo que favorecería indirectamente un incremento de la actividad de la hemaglutinina. (Tal interpretación no es asumida por otros autores.)

En 2001, el especialista del Instituto Pasteur de París C. Hannoun señalaba que la neuraminidasa de 1918 es la «antepasada de la de todas las cepas de virus porcinos y humanos ulteriores. *El virus pandémico parece haber tomado tanto su neuraminidasa como su hemaglutinina de un virus aviar, mientras que el resto de su secuencia es de origen humano*» (8). En cuanto al momento en que dicho

virus recombinante se introdujo en los mamíferos (cerdo u hombre), estima que esto pudo tener lugar «algún tiempo antes o justo antes de la pandemia» [de 1918] (8). Asimismo, coincidiendo con lo expresado por otros autores, especialmente Webster (7), considera Hannon que es verosímil que *la virulencia sea un carácter poligénico*, y que pequeños cambios en nucleótidos dispersos en el genoma, afectando no sólo a la hemaglutinina, hayan contribuido a tan intensa virulencia.

No obstante, Laver y Garman (28), también en 2001, escribían que era aún desconocido si la recombinación del gen de la hemaglutinina fue «el disparador» que causó el efecto que ocasionara que el agente fuera tan virulento.

En paralelismo con otros trabajos antes comentados, J. Oxford y cols. han intentado realizar en el año 2002 estudios en muestras de diez personas fallecidas en Twickenhan (cerca de Londres) a causa de la pandemia en 1918 y que fueron enterradas en ataúdes de plomo, hallándose los restos de una joven en mejor estado de conservación que los de los otros. Sus resultados no se han divulgado.

Prosiguiendo su línea de investigación anterior, Fanning *et al.*, en 2002 (29), después de analizar *muestras* (conservadas en etanol del 70 por 100), *procedentes de aves acuáticas salvajes capturadas en 1917*, que habían sufrido infección por otros virus del mismo subtipo de hemaglutinina que el causante de la pandemia de 1918, encontraron que las hemaglutininas de las aves de 1917 y las de las aves actuales son más cercanas entre sí que las hemaglutininas de las aves de 1917 respecto a la de la pandemia de 1918. De ello han deducido «que hubo poca deriva en las secuencias aviares en los últimos 83 años, y que *el virus de la pandemia de 1918 no adquirió su hemaglutinina directamente de las aves*» (29).

En 2002 asimismo, Tumpey, García-Sastre (éste, antiguo discípulo y colaborador de E. Villar y J. A. Cabezas), Mikulasova, Taubenberger, Swayne, Palese y Basler (30), basándose en los datos ya conocidos sobre secuencias nucleotídicas, *lograron reconstruir los genes de la hemaglutinina, de la neuraminidasa y de la proteína M del virus de 1918, y consiguieron obtener virus de gripe recombinantes portadores de segmentos de dicha hemaglutinina, neuraminidasa y*

proteína M. Estos virus recombinantes fueron *sensibles* a los inhibidores de la neuraminidasa *zanamivir* y *oseltamivir*, así como a los inhibidores de la proteína M2 *amantadina* y *rimantadina* (véase el trabajo de la referencia 6). De ello se deduce que estos agentes serían de utilidad ante la temida probabilidad de que surjan virus de propiedades similares al causante de la pandemia de 1918.

Reid *et al.* (Fanning..., Taubenberger) (31), prosiguiendo sus trabajos anteriores (especialmente el correspondiente a la referencia 29), han confirmado en el año 2003 sus resultados relativos a la hemaglutinina aviaria, ampliándolos a otros componentes víricos como la *nucleoproteína*, *NP*, deduciendo que «las secuencias NP aviares de 1917 están estrechamente relacionadas con las secuencias de las aves modernas y [son] distintas de las de los mamíferos de 1918» (31).

Ya en el año 2004, Harvey *et al.* (32) han hallado que dos mutaciones simultáneas en el sitio receptor de la unión («receptor binding site») de la hemaglutinina aviar del subtipo H5 producen en ella un patrón similar al que muestran los virus humanos.

En febrero de 2004, Gamblin *et al.* (entre ellos Wiley y Skehel) (33) han determinado las estructuras de la hemaglutinina del virus de la gripe de 1918 y de las hemaglutininas estrechamente relacionadas con ella (la humana de 1934 y la porcina de 1930) formando complejos con análogos estructurales del receptor. Confirmando hallazgos sobre la especificidad de las uniones de las hemaglutininas (α 2,3 para las aviares, α 2,6 y α 2,3 para las porcinas), deducen que «la hemaglutinina [humana] de 1918, reteniendo los aminoácidos del sitio receptor característicos de una hemaglutinina precursora aviar, es capaz de unirse a receptores humanos, y como consecuencia de ello el virus es capaz de difundirse en la población humana» (33).

Ahora bien, «el mecanismo que los virus humanos han utilizado para lograr estos cambios parecen ser diferentes según los distintos subtipos. Para las hemaglutininas de virus humanas H2 y H3 [se requiere] un mínimo de dos cambios en los aminoácidos del sitio de unión: [La sustitución de] glutamina 226 por leucina y de glicocola 228 por serina se correlaciona con el cambio brusco («shift») producido de aviario a humano. Por el contrario, la hemaglutinina de

virus H1 adquiere la capacidad de unirse a receptores humanos manteniendo la glutamina 226 y la glicocola 228» (33). Es decir, el asunto es más intrincado de lo que pudiera inicialmente esperarse, y faltan por esclarecerse algunos aspectos relacionados.

También en el mismo número de la revista *Science*, en que se ha publicado el trabajo inmediato anterior aparece otro, con él vinculado, de Stevens *et al.* (entre ellos Taubenberger y Palese) (34), relativo a la «*estructura de la hemaglutinina humana H1, no escindida, del extinguido virus de la gripe de 1918*». Después de ensamblar el gen de la hemaglutinina a partir de fragmentos de ARN de muestras tomadas de tejido pulmonar de 1918 conservadas en formol, llegan a la conclusión de que ciertas características encontradas («sitio del receptor similar al aviar, dos nuevos componentes con histidina, un bucle de menor superficie expuesto al sitio de escisión [de la hemaglutinina] que activa la fusión vírica) *revelan aspectos estructurales hallados en virus aviares que pueden haber contribuido a la extraordinariamente elevada capacidad de infección y mortalidad observada en 1918» (34).*

Holmes, en un trabajo titulado «1918 and All That» (35), que comenta las dos inmediatamente antes indicados, confirma que «*la epidemia de 1918 no ha entregado todavía sus secretos. Un enigma que continúa es si la pandemia se inició tan pronto como el virus saltó desde las aves a los humanos, o si hubo un período pre-pandémico durante el cual el virus se difundió en otras especies de mamíferos (quizá el cerdo)*».

En octubre de 2004, la investigación publicada en *Nature* por Kobasa [...] Kawaoka (36) se refiere a sus resultados sobre la obtención artificial de virus recombinantes de gripe conteniendo los genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa de la cepa de 1918, los cuales mostraron elevada patogenicidad en ratones, por inducir *la producción excesiva de citoquinas que ocasionarían procesos inflamatorios y hemorragias graves*. Recuérdese que las citoquinas son generalmente proteínas o glicoproteínas que actúan como señales intercelulares, implicadas en la regulación y la proliferación celular. En este caso, un descontrol de la producción normal de las mismas, al ser ésta excesiva, resultaría no beneficioso sino altamente perjudicial para la célula hospedadora.

Un trabajo simultáneo de Siren *et al.* (37) también concluye que los macrófagos infectados por virus de la gripe tipo A (o por virus Sendai) activan células asesinas por la vía de las *citoquinas* y la producción de γ -interferón.

6. DATOS RECIENTES RELATIVOS A LOS VIRUS DE LA GRIPE AVIAR

El interés y la preocupación que suscita el riesgo de aparición de brotes epidémicos —que podrían derivar en pandemia— a partir del virus de la gripe de aves o por implicación de mamíferos distintos de los humanos, se observa también en las numerosas publicaciones que han visto la luz en los diez primeros meses de 2004 relativos a estos virus.

Seguidamente, se intentará hacer aquí sólo un breve resumen de algunos de los aspectos considerados como más destacados. Así: El análisis de la secuencia del genoma del virus aviar H5N1 aislado de pollos en Tailandia (38); «la evolución de los virus de gripe H5N1 de patos salvajes en el sur de China» (39); los estudios de la proteína matriz (M) de aves acuáticas (40); la redistribución al azar de los genes de virus de gripe tipo A en patos salvajes de Canadá, sugiriendo los autores que *los genes de los constituyentes víricos «PB2 y PA pueden ser utilizados como marcadores de virus con potencial para cruzar la barrera de la especie», al poder pasar al cerdo* (41); las «limitaciones a la adaptación de la hemaglutinina H5 de un virus [aviar] al hospedador humano» (42); la «*glicosilación adicional de la cabeza de la neuraminidasa [que] contribuyó a la elevada virulencia del virus H5N1*», confirmándose también «que las actividades de la hemaglutinina y de la neuraminidasa se hallan funcionalmente ligadas» (43) y, paralelamente (aunque no en relación con el virus de la gripe aviar), el «efecto de la adición de oligosacáridos sobre las actividades biológicas y la antigenicidad de la hemaglutinina del virus de la gripe H3N2» (44).

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que animales de especies consideradas como resistentes al virus de la gripe H5N1, tales como a la que pertenecen los *gatos domésticos*, una vez inoculados intratraquealmente con ese virus, han sido infectados, por

lo que pueden contribuir a la transmisión de dicho virus (45); y en septiembre de 2004 ya se publicó que lo mismo ha sucedido con los *tigres*, tal vez por haber sido éstos alimentados en algún zoo con pollos infectados (46).

Análogamente, «los genes de la hemaglutinina y de la neuraminidasa de virus porcinos de gripe A (H9N2) aislados en China probablemente provenían de los de gripe aviar A (H9N2)», pudiendo pasar de no patógenos a patógenos en los cerdos (47). Asimismo, la secuencia del genoma de un recombinante del virus porcino chino resultó similar a las de virus de gripe prevaletentes en pollos y patos del sur de China (48).

En una publicación del mes de julio de 2004, en *Nature*, Li [...], Webster y cols., destacan que *los patos domésticos del sur de China tuvieron en el brote epidémico de 2003-04 un papel importante «en la generación y mantenimiento de este virus [el H5N1], y que las aves salvajes pueden haber contribuido a la amplia difusión creciente del virus en Asia. [...] Los virus H5N1 con potencial pandémico han llegado a ser endémicos en la región y no son fácilmente erradicables [...] por lo que se necesita aplicar medidas de control a largo plazo»* (49). Algunos de estos autores (en colaboración con otros) (50, 51) habían ya señalado en mayo de 2004 al virus H5N1 como una amenaza de causa de pandemia; y también lo han sugerido otros investigadores, en fechas casi coincidentes, en la revista *Science* (52).

Ya en agosto de 2004 eran nueve los países asiáticos que oficialmente habían reconocido (46) haber sufrido muertes (26 personas) por el virus H5N1, según se indica en la tabla que se adjunta (Tabla 1).

TABLA 1. *Subtipos del Tipo A del virus de la gripe aislados de varias especies de aves y mamíferos*

<i>Año</i>	<i>Lugar</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Especie</i>	<i>Peculiaridades</i>
1983	EE.UU.	H5N2	Pollos	Hubo que sacrificar 17 millones, con pérdidas de 61 millones de \$
1997	Holanda	H7N7	Pollos	Sacrificio de 20 millones de pollos + un veterinario muerto
1997	HongKong	H5N1	Pollos + humanos	18 personas enfermas. 6 muertas
1998	—	H5N1	Ídem	El virus, de pollos a humanos directamente
1998	—	H7N7	Pavos + Humanos	—
1999	—	H5N1	Humanos	El virus, de humanos a humanos directamente (confirmado en 2003)
1999	—	H5N1	Pollos	Hospedadores intermedios
1999	HongKong	H9N2	Humanos	2 enfermos
2000	Siberia	H5N1, H2N2, H3N2, H9N2, H7N7	Patos salvajes	Precursores de pandemias futuras
2001	—	H9N2	Cerdos	El virus, de aves a cerdos. En humanos, cocirculación de H3N2
2002	—	—	—	Riesgo: Infección simultánea de virus aviarios y humanos
2003	—	—	Patos + Codornices	El virus, de patos salvajes a codornices
2004	—	Varios	Humanos	En Japón, Laos, Taiwán, Camboya, Corea del Sur, Vietnam, Pakistán, Tailandia y (desde agosto de 2004) Malasia

Datos relativos a otro subtipo aviar, el H7N7, han sido publicados también en 2004 (53, 54); y, asimismo, referentes al tipo humano B, en relación con una infección que se produjo en peregrinos a La Meca (55), o a la redistribución genética y evolución de virus de la gripe humanos tipos A y B (56).

Por otro lado, progresos notables se han producido recientemente en los *métodos analíticos* destinados a la mejor caracterización del virus de la gripe, adaptando y perfeccionando técnicas como la de la reacción en cadena de la polimerasa, etc. (57, 58).

Finalmente, medidas dirigidas al control del subtipo aviar H5 han sido revisadas (59), y diversos trabajos se han publicado en relación con el uso de *vacunas* de muy diversas características (recombinantes, de virus atenuados, etc.) con objeto de proteger a las aves de granjas (60-63), aunque al parecer no siempre con resultado satisfactorio (64), ya que también su elaboración plantea más problemas (hasta de índole jurídica, por la protección patentada de procedimientos, etc.) que la de las vacunas para uso humano (65).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HANNOUN, C. (1995). *La grippe et ses virus*. Presses Universitaires de France. París.
- (2) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1990). *Datos sobre las pandemias de gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa de los virus de la gripe A y B y la esterasa del virus C*. Discurso de recepción (R. Acad. Farm.) Madrid.
- (3) BAÑUELOS, M. (1947). *Manual de Patología Médica*. Editorial Científica Médica. Barcelona. Tomo I, págs. 6-30.
- (4) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A., y HANNOUN, C. (1990). *Inv. Ciencia* 159: 61-69.
- (5) GROUPE ECRIR (2000). *La grippe: aspects actuels*. Flammarion. París.
- (6) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (2004). *Datos sobre el virus de la gripe de patos salvajes y de pollos, y virus de la gripe tipo C. Agentes antigripales*. Reales y Nacionales Academias de Medicina y de Farmacia (sesión monográfica).
- (7) WEBSTER, R. G. (2001). *Science* 293: 1773-1774.
- (8) HANNOUN, C. (2001). *Virologie* 5: 45-52.
- (9) KENDREW, Sir J., ed. (1995). *The encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell. Oxford, págs. 467, 468, 544, 545.
- (10) KILBOURNE, E. D. (1987). *Influenza*. *Plenum Med. Co.* New York, NY, págs. 46, 47.

- (11) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1978). *An. R. Acad. Farm.* 44: 493-509.
- (12) GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1992). *Biochem. J.* 273: 435-441.
- (13) MUÑOZ-BARROSO, I.; GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A. (1992). *Virus Res.* 25: 145-153.
- (14) CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A., HANNOUN, C. (1998). *Biochim. Biophys. Acta.* 616: 228-238.
- (15) NAEVE, C. W.; HINSHAW, V. S., WEBSTER, R. G. (1984). *J. Virol.* 51: 567-569.
- (16) SAUTER, N. K.; BEDNARSKI, M. D.; WURZBURG, B. A.; HANSON, J. E.; WHITESIDES, G. M.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1989). *Biochem.* 28: 8988-8394.
- (17) ITO, T.; NELSON, J.; COUCEIRO, S. S.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUSS, J.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; KIDA, H.; PAULSON, J. C.; WEBSTER, R. G., KAWAOKA, Y. (1998). *J. Virol.* 71: 7367-7373.
- (18) WEIS, W.; BROWN, J. H.; CUSAK, S.; PAULSON, J. C.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1998). *Nature* 333: 426-431.
- (19) SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (2000). *Annu. Rev. Biochem.* 69: 531-569.
- (20) MATROSOVICH, M.; TUZIKOV, A.; BOVIN, N.; GAMBARYAN, A.; KLIMOV, A.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I., KAWAOKA, Y. (2002). *J. Virol.* 74: 8502-8510.
- (21) HA, Y.; STEVENS, D. J.; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (2002). *EMBO J.* 21: 865-875.
- (22) MANUGUERRA, J.-C. (1996). Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (Reunión en Lisboa).
- (23) TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; KRAFFT, A. E.; BIJWAARD, K. E., FANNING, T. G. (1997). *Science* 275: 1793-1796.
- (24) REID, A. H.; FANNING, T. G.; HULTIN, J. K., TAUBENBERGER, J. K. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1561-1556.
- (25) WEBSTER, R. G. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1164-1166.
- (26) REID, A. H.; FANNING, T. G., JANCZEWSKI, TAUBENBERGER, J. K. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6785-6790.
- (27) GOTOM, H., KAWAOKA, Y. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10224-10228.
- (28) LAVER, G., GARMAN, E. (2001). *Science* 293: 1776-1777.
- (29) FANNING, T. G.; SLEMONS, R. D.; REID, A. H.; JANCZEWSKI, T. A.; DEAN, J., TAUBENBERGER, J. K. (2002). *J. Virol.* 76: 7860-7862.
- (30) TUMPEY, T. M.; GARCÍA-SASTRE, A.; MIKULOSOVA, A.; TAUBENBERGER, J. K.; SWAYNE, D. E.; PALESE, P., BASLER, C. F. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13849-13854.
- (31) REID, A. H.; FANNING, T. G.; SLEMONS, R. D.; JANCEWSKI, T. A.; DEAN, J.; TAUBENBERGER, J. K. (2003). *Avian Dis.* 47: 921-925.
- (32) HARVEY, R.; MARTIN, A. C.; ZAMBON, M., BARCLAY, W. S. (2004). *J. Virol.* 78: 502-507.
- (33) GAMBLIN, S. J.; HAIRE, L. F.; RUSSELL, R. J.; STEVENS, D. J. M.; XIAO, B.; HA, Y.; VASISHT, N.; STEINHAEUER, D. A.; DANIELS, R. S.; ELLIOT, A.; WILEY, D. C., SKEHEL, J. J. (2004). *Science* 303: 1838-1842.
- (34) STEVENS, J.; CORPER, A. L.; BASLER, C. F.; TAUBENBERGER, J. K.; PALESE, P., WILSON, I. A. (2004). *Science* 303: 1866-1870.
- (35) HOLMES, E. C. (2004). *Science* 303: 1787-1788.
- (36) KOBASA, D. [...], KAWAOKA, Y. (2004). *Nature* 431: 703-707.

- (37) SIREN, J. [...], MATIKAINENE, S. (2004). *J. Gen. Virol.* 85: 2357-2364.
- (38) VISESHAKUL, N. [...], POOVORAWAN, Y. (2004). *Virology* 328: 169-176.
- (39) CHEN, H. [...]; WEBSTER, R. G., YU, K. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10452-10457.
- (40) WIDJAJA, L. [...], WEBSTER, R. G. (2004). *J. Virol.* 78: 8771-8779.
- (41) HATCHETTE, T. F. [...], WEBSTER, R. G. (2004). *J. Gen. Virol.* 85: 2227-2237.
- (42) HARVEY, R. [...]; BARCLAY, W. S. (2004). *J. Virol.* 78: 502-507.
- (43) HULSE, D. J., WEBSTER, R. G. [...] (2004). *J. Virol.* 78: 9954-9964.
- (44) ABE, X. [...], HONGO, S. (2004). *J. Virol.* 78: 9605-9611.
- (45) KUIKEN, T. [...], OSTERHAUS, A. (2004). *Science* 306: 241.
- (46) ENSERINK, M., KAISER, J. (2004), *Science* 305: 138.
- (47) GUO, Y. J. [...], GUO, J. F. (2004). *Zhonghua Shi Yan* 18: 7-11.
- (48) XU, C. [...], ZHAO, H. (2004). *Microbes Infect.* 6: 919-925.
- (49) LI, K. S. [...]; WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. M. (2004). *Nature* 430: 209-213.
- (50) GUAN, Y. [...]; WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. M. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8156-8109.
- (51) PEIRIS, J. S. [...], GUAN, Y. (2004). *Lancet* 363: 617-619.
- (52) NORMILE, D., ENSERINK, M. (2004). *Science* 305: 321.
- (53) FOUCHIER, R. A. M. [...], OSTERHAUS, A. D. M. E. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1356-1361.
- (54) MATROSOVICH, M. N. [...], KLENK, H. D. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4620-4624.
- (55) BALKHY, H. H. [...], ALMUNEEF, M. A. (2004). *J. Travel. Med.* 11: 82-86.
- (56) XU, X. [...]; SUBBARAO, K.; COX, N. J., KLIMOV, A. (2004). *Virus Res.* 103: 55-60.
- (57) LAU, L. T. [...], YU, A. C. H. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 336-342.
- (58) TEMPLETEN, K. E. [...], CLAAS, E. C. (2004). *J. Clin. Microbiol.* 42: 1564-1569.
- (59) CAPUA, I., ALEXANDER, D. J. (2004). *Avian Pathol.* 33: 393-404.
- (60) WOOD, J. M., ROBERTSON, J. G. (2004). *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 842-847.
- (61) ELLIS, T. M. [...], PEIRIS, M. J. S. (2004). *Avian Pathol.* 33: 405-412.
- (62) CEE, C. N. [...], SUÁREZ, D. L. (2004). *Vaccine* 22: 3178-3181.
- (63) STEPHENSON, I. [...], KATZ, J. M. (2004). *Lancet Infect. Dis.* 4: 499-509.
- (64) LEE, C. W. [...], SUÁREZ, D. I. (2004). *J. Virol.* 78: 8372-8381.
- (65) NORMILE, D. (2004). *Science* 303: 609.

Nota añadida en las pruebas de imprenta:

Otros trabajos relevantes relacionados con los temas de este artículo son los siguientes:

- TUMPEY, T. M. *et al.* (2004). *J. Viral.* **18**: 9499-9511.
 UNGCHUSAK, K. *et al.* (2005). *N. Engl. J. Med.* **352**: 333-340.
 STÖHR, K. (2005). *N. Engl. J. Med.* **352**: 405-407.
 PTAUBENBERGER, J. K. *et at.* (2005). *Scient. Am, Jan*: 48-57.

————— *Artículo original* —————

**Globalización de los requisitos
para la comercialización de medicamentos:
importancia de la humedad ambiental
en el diseño de los estudios de estabilidad (*)**

ANA ISABEL TORRES SUÁREZ Y

MARÍA ESTHER GIL ALEGRE

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid*

RESUMEN

Se revisan y analizan las condiciones de almacenamiento de las muestras para los estudios de estabilidad recogidas en la normativa elaborada por el ICH, y se propone incorporar un estudio a diferentes humedades relativas (una superior y otra inferior a la propuesta en las «condiciones de almacenamiento de las muestras») en el caso de medicamentos sólidos en envases semipermeables.

Palabras clave: Estabilidad.—Humedad.—ICH.—Vitamina C.

ABSTRACT

The storage conditions of the samples in the stability studies according to ICH normative are revised and analysed. An additional study at different relative humidities (higher and lower than that proposed in «storage conditions of the samples») in case of drug products in semi permeable containers is proposed.

Key words: Stability.—Humidity.—ICH.—Vitamin C.

(*) Premio Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

ANTECEDENTES

El 1 de enero de 1998 entra en vigor, en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos, la directriz principal (1) ICH Q1A, elaborada por el Comité Internacional de Armonización, relativa a «Los Procedimientos de los Estudios de Estabilidad de Nuevos Principios Activos y Medicamentos». Este documento unifica los requerimientos mínimos de datos sobre estabilidad exigidos para el registro para la comercialización de nuevos principios activos y medicamentos, por las autoridades de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón.

A esta primera directriz han seguido otras quince, también relacionadas con los requisitos de los estudios de estabilidad de medicamentos de uso humano. Todos estos documentos elaborados por el ICH fueron concebidos para su aplicación en estas tres áreas de comercialización (la Unión Europea, Japón y Estados Unidos), pero en la práctica han sido adoptados por las Autoridades Reguladoras de terceros países, en muchos casos en vías de desarrollo, para las que estos documentos suponen una reglamentación contrastada y revisada por expertos de numerosos países que garantiza la calidad del producto cuya comercialización autoricen. Evidentemente, para exigir el mismo protocolo para los estudios de estabilidad, el país que adopta la normativa ICH ha de pertenecer a una de las zonas climáticas (la zona I o la zona II) para las que fueron desarrollados estos documentos, ya que la estabilidad de los medicamentos claramente depende de las condiciones de conservación de los mismos, que varían en función de la zona climática.

Este interés de terceros países por la normativa elaborada ha llevado recientemente al ICH a publicar un nuevo documento: ICH Q1F (2), donde se definen las condiciones de almacenamiento de las muestras en los estudios de estabilidad cuando se pretende comercializar el medicamento en cualquiera de las otras dos zonas climáticas (III y IV) y donde, además, se proponen unas únicas condiciones de almacenamiento de las muestras para los estudios de estabilidad que permitirían la comercialización, con garantías, de un medicamento en cualquier región del mundo.

En este trabajo se revisan y se analizan las condiciones de almacenamiento de las muestras para los estudios de estabilidad recogi-

das en toda esta normativa. Se cuestiona la validez de la propuesta de unas únicas condiciones de almacenamiento de las muestras para la comercialización de un medicamento en cualquier región del mundo, para lo que se realiza un estudio de estabilidad sobre un medicamento sólido en envase semipermeable, evaluándose el impacto de la humedad ambiental en la estabilidad del mismo.

MEDICAMENTOS QUE SE VAN A COMERCIALIZAR EN CUALQUIERA DE LAS TRES ÁREAS DE APLICACIÓN DE LA NORMATIVA ICH (ZONAS CLIMÁTICAS I Y II)

La directriz principal establece la necesidad de aportar datos sobre estudios de estabilidad a largo plazo y estudios acelerados (e intermedios). El principal objetivo del estudio de estabilidad a largo plazo es determinar el período de validez, y por ello en este estudio se almacenarán las muestras en condiciones que representen las condiciones previstas de conservación del medicamento una vez comercializado.

Las condiciones de almacenamiento de las muestras en el estudio acelerado e intermedio son más severas que en el estudio a largo plazo, con el fin de contemplar aquellas condiciones en las que se pudiera encontrar el medicamento fundamentalmente durante su distribución.

Se contemplan dos situaciones diferentes: la de medicamentos que se van a conservar en condiciones medioambientales, y la de medicamentos que se van a conservar a bajas temperaturas.

A) Medicamentos que se van a conservar en condiciones medioambientales

Estudio a largo plazo: En función de los datos climáticos el mundo se divide en las cuatro zonas climáticas de la Tabla 1. La temperatura cinética media derivada se calcula a partir de la temperatura cinética media, pero se incorpora un margen de seguridad como consecuencia del análisis de datos climatológicos de ciudades específicas.

Esta directriz principal para los estudios de estabilidad fue desarrollada pensando en la comercialización y, por tanto, conservación de medicamentos en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos, que están incluidos en las zonas climáticas I y II. A la hora de proponer un período de validez se consideran como condiciones de conservación las más extremas (las de la zona climática II), y las condiciones de almacenamiento de las muestras de los estudios de estabilidad a largo plazo se establecen de acuerdo a estas condiciones de conservación, esto es, una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa ambiental constante del $60\% \pm 5\%$ (Tabla 2).

TABLA 1. *Definición de las diferentes zonas climáticas*

<i>Zona climática</i>	<i>Tipo de clima</i>	<i>Temperatura cinética media derivada ($^{\circ}\text{C}$)</i>	<i>Humedad relativa (%)</i>
I	Templado	21	45
II	Subtropical (mediterráneo)	25	60
III	Cálido, seco	30	35
IV	Cálido, húmedo	30	70

TABLA 2. *Condiciones generales de almacenamiento de las muestras*

<i>Estudio</i>	<i>Condiciones de almacenamiento</i>
Largo plazo	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$
Intermedio *	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$
Acelerado	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$

* Cuando ocurra «cambio significativo» durante los seis meses de almacenamiento bajo condiciones aceleradas, se llevará a cabo un ensayo adicional en condiciones intermedias.

Estudio acelerado e intermedio: en los estudios acelerados habitualmente se trabaja a una temperatura al menos 15 grados por encima de la temperatura del estudio a largo plazo, y a una humedad relativa mayor.

El poder predictivo de los datos de estabilidad química procedentes de este estudio acelerado se fundamenta en la ecuación de Arrhenius. Asumiendo una energía de activación de 83 kJ/mol, una pérdida de potencia del x % a los seis meses de almacenamiento a 40° C se correspondería con 30 meses (6 × 5) de almacenamiento a 25° C.

$$\frac{K_{40}}{K_{25}} = \frac{e^{-\frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{313}}}{e^{-\frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{298}}} = 4,98 \approx 5$$

ECUACIÓN 1. *Ecuación de Arrhenius para dos temperaturas de almacenamiento (R = 8,3 · 10⁻³ KJ °K/mol y Ea = 83 KJ/mol)*

En realidad, por supuesto, no en todos los medicamentos la energía de activación es de 83 kJ/mol. Este es un valor promedio, y lo correcto sería utilizar en este cálculo el valor de energía de activación obtenido experimentalmente para cada producto. Entre las diferentes formas farmacéuticas, la energía de activación puede variar entre 5 y 240 kJ/mol, de manera que el factor de predicción de estabilidad a 25° C oscilaría entre 1,1 y 100. En el caso de las disoluciones, con valores de energía de activación entre 40 y 125 KJ/mol, la oscilación del factor de predicción a 25° C sería más estrecha: de 2,2 a 11.

Cuando durante los seis meses de almacenamiento bajo condiciones aceleradas, se detecta un «cambio significativo» en el medicamento, se ha de realizar un estudio adicional en condiciones intermedias. En este estudio las muestras se almacenan a una temperatura constante de 30° C ± 2° C y a una humedad relativa ambiental constante del 65 % ± 5 %.

En el caso de los medicamentos líquidos con vehículo acuoso envasados en envases semipermeables, el estudio de estabilidad ha de demostrar que estos productos pueden conservarse en ambientes de baja humedad relativa, donde la posibilidad de pérdida de solvente es mayor. Esta evaluación puede llevarse a cabo mediante dos procedimientos:

- Almacenamiento de las muestras del estudio de estabilidad bajo las condiciones de humedad relativa baja recogidas en la Tabla 3.

TABLA 3. *Condiciones de almacenamiento para medicamentos envasados en envases semipermeables*

<i>Estudio</i>	<i>Condiciones de almacenamiento</i>
Largo plazo	25° C ± 2° C/40% HR ± 5%
Intermedio	30° C ± 2° C/35% HR ± 5%
Acelerado	40° C ± 2° C/no más de 25% HR

- Realizar los estudios de estabilidad en las condiciones de almacenamiento generales, determinar la pérdida de agua en estas condiciones y calcular, matemáticamente, la pérdida de agua en las condiciones de baja humedad ambiental de la Tabla 3. Este cálculo matemático se puede basar en la determinación experimental del coeficiente de permeación del sistema de acondicionamiento, o bien en la utilización de la relación entre las velocidades de pérdida de agua a dos humedades relativas, cuando la temperatura es la misma (Tabla 4). Así, por ejemplo, si se detecta una pérdida de agua de Z % en muestras almacenadas durante un determinado período de tiempo a 40° C y 75 % HR, la pérdida de agua si esas muestras se hubieran almacenado durante ese mismo período a 40° C y 25 % HR, habría sido de (Z × 3) %.

TABLA 4. *Relación entre las velocidades de pérdida de agua a dos humedades relativas, y la misma temperatura*

<i>Humedad relativa alternativa</i>	<i>Humedad relativa de referencia</i>	<i>Relación entre las velocidades de pérdida de agua</i>
60 % HR	25 % HR	1,9
60 % HR	40 % HR	1,5
65 % HR	35 % HR	1,9
75 % HR	25 % HR	3,0

Medicamentos que se van a conservar a bajas temperaturas

Se recomiendan condiciones de almacenamiento específicas para medicamentos que, por sus características de estabilidad, se conservarán en refrigerador y en congelador. Evidentemente, estas condiciones de almacenamiento serán independientes de la zona de comercialización del medicamento.

MEDICAMENTOS QUE SE VAN A COMERCIALIZAR EN CUALQUIER ZONA CLIMÁTICA: ADAPTACIÓN DEL PROCEDIMIENTO PROPUESTO EN LA DIRECTRIZ PRINCIPAL

Aunque los documentos elaborados por el Comité Internacional de Armonización son de aplicación en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos, han sido adoptados por las autoridades sanitarias de otros muchos países de las mismas zonas climáticas (I y II). Resultaría de utilidad el disponer de un protocolo para los estudios de estabilidad que fuera válido para la comercialización de medicamentos en cualquier región del mundo.

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud publicó un documento sobre «Estudios de estabilidad de medicamentos con principios activos conocidos en formas farmacéuticas convencionales» (3), actualizado en el Informe de la 37 reunión del Comité de Expertos sobre Preparaciones Farmacéuticas de la OMS celebrada posteriormente (4). En este documento se recogen recomendaciones para los estudios de estabilidad de medicamentos, incluyendo las condiciones de almacenamiento adecuadas para la comercialización en las cuatro zonas climáticas.

Recientemente el Comité Internacional de Armonización se ha apoyado en este documento para elaborar la guía ICH Q1F, relativa a los «Procedimientos para los estudios de estabilidad en las zonas III y IV» (2), con la que se persigue la armonización de los estudios de estabilidad necesarios para la comercialización de un medicamento en cualquier parte del mundo. Esta globalización resultará beneficiosa para las industrias farmacéuticas multinacionales al agilizarse los trámites y disminuir el tiempo necesario para la

comercialización de sus productos en cualquier región del mundo. También resultará beneficiosa para los países de las zonas climáticas III y IV, que dispondrán de una reglamentación sobre los estudios de estabilidad para la comercialización de medicamentos elaborada por expertos y ratificada en el ámbito internacional (en general los países pertenecientes a estas zonas climáticas presentan un bajo nivel de desarrollo, por lo que la reglamentación en el campo farmacéutico es escasa), bien es verdad que este beneficio sanitario tiene como contrapartida la dificultad que supone, desde el punto de vista económico y político, el obligar a cumplir una reglamentación tan estricta y costosa a las empresas farmacéuticas nacionales.

Estudios a largo plazo: Las condiciones climáticas en los países pertenecientes a las zonas III y IV están recogidas en la Tabla 1. Se podrían simplificar los estudios de estabilidad si, igual que ocurre con las zonas climáticas I y II, se pueden proponer las mismas condiciones de almacenamiento para las dos zonas climáticas: III y IV. La diferencia entre ambas está en la humedad relativa (35 y 70 %). Buscando las condiciones más desfavorables para la estabilidad del principio activo o medicamento se seleccionarían como condiciones de almacenamiento generales para los estudios a largo plazo en ambas zonas climáticas: 30° C y 70 % de HR. Evidentemente, esto obligaría a utilizar acondicionamientos impermeables para medicamentos líquidos con vehículo acuoso que se van a comercializar en la zona III, o bien, a la realización del estudio de estabilidad en condiciones de menor humedad relativa ambiental, situación también contemplada en la directriz principal elaborada por el ICH.

Sin embargo éstas no son las condiciones propuestas por el ICH, que va más allá en su intento de armonización y simplificación de los requisitos de los estudios de estabilidad para la comercialización de un medicamento: propone como condiciones de almacenamiento generales de las muestras, cuando se solicita la comercialización en las zonas climáticas III y IV, 30° C y 65 % de HR. De esta forma, si se desea comercializar un principio activo o un medicamento en el ámbito mundial, el estudio a largo plazo a 30° C y 65 % de HR resultaría una alternativa al estudio a 25° C y 60 % de HR definido únicamente para las zonas I y II, que ya no sería necesario.

El mismo criterio se sigue al establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras para medicamentos con vehículo acuoso envasados en envases semipermeables: 30° C y 35 % de HR.

Además de estas dos situaciones arriba comentadas (el caso general y el caso especial de medicamentos con vehículo acuoso en envases semipermeables), en el documento se contempla la necesidad de realizar, en algunos casos, estudios de estabilidad adicionales a humedades ambientales más elevadas, por ejemplo a 25° C y 80 % de HR. Estos ensayos están especialmente recomendados en el caso de medicamentos sólidos envasados en envases semipermeables que se pretenden comercializar en zonas de humedad ambiental especialmente alta dentro de la zona climática IV.

Por último, en el documento se indica que en aquellos casos en los que no se pueda demostrar que un producto es estable cuando se almacena a 30° C y 65 % de HR, puede ser apropiado proponer un período de validez menor, sustituir el envase primario por uno que garantice la protección del contenido frente a los agentes medioambientales, o incluir alguna leyenda en el etiquetado que advierta sobre las precauciones a tomar para su conservación.

Estudios acelerados: Con el fin de armonizar al máximo las condiciones de almacenamiento en los estudios de estabilidad, se asumen, para las zonas climáticas III y IV, las mismas condiciones que para las zonas I y II, esto es, 40° C y 75 % de HR. Con estas condiciones se alcanzan los objetivos de los estudios acelerados, teniendo en cuenta que en un estudio climatológico realizado en nueve ciudades de la zona climática III (5) no se observó, durante el año, ningún día con una temperatura media superior a los 40° C. En el mismo estudio realizado en doce ciudades de la zona climática IV, se observó que únicamente diez días al año se sobrepasaron los 40° C, pero en estos días la humedad relativa ambiental fue muy baja. No obstante, para garantizar la estabilidad del medicamento durante estancias cortas en condiciones más extremas, por ejemplo, durante la distribución, el ICH recomienda realizar un estudio, por ejemplo, sobre un lote del medicamento y con una duración de hasta tres meses, a una temperatura de 50° C y humedad ambiental, para abarcar ambientes especialmente calurosos y secos; y a una temperatura de 25° C y una humedad relativa del 80 %, para abarcar condiciones de humedad ambiental especialmente altas.

En cuanto a la capacidad de predicción de la estabilidad química de un medicamento durante su conservación, a partir de los resultados de los estudios acelerados sólo hay que calcular, con la ecuación 1, el factor de predicción de estabilidad (FPE) para estas dos temperaturas (40° C y 30° C).

TABLA 5. *Características de los estudios de estabilidad a nivel mundial*

<i>Estudio</i>	<i>Condiciones de almacenamiento</i>
<i>Largo plazo:</i>	
Caso general	30° C ± 2° C/65 ± 5% HR
Líquidos en envases semipermeables	30° C ± 2° C/35 ± 5% HR
<i>Acelerado:</i>	
Caso general	40° C ± 2° C/75 ± 5% HR
Líquidos en envases semipermeables	40° C ± 2° C/≤ 25% ± 5% HR

Por último, y a modo de resumen, en la Tabla 5 quedan recogidas las condiciones de los estudios de estabilidad propuestas para las zonas climáticas III y IV, que también serían las recomendadas, si se desea, con el menor número de estudios de estabilidad, la comercialización de un principio activo o un medicamento en cualquier región del mundo.

COMENTARIOS

Comercialización en las zonas climáticas I y II

El asumir como temperatura de almacenamiento la de la zona II frente a la de la zona I (21° C), tiene como consecuencia práctica que los medicamentos comercializados en países de la zona climática I pueden presentar una mayor estabilidad (un mayor tiempo cumpliendo con sus especificaciones) que la prevista, esto es, se podría haber propuesto un período de validez mayor. Esto es así porque, al aumentar la temperatura, aumenta la velocidad de las reacciones químicas y, en general, se acelera la alteración de los medicamentos. Al realizarse el estudio a una temperatura igual o mayor que la de

conservación, queda garantizada la estabilidad de producto sea cual sea la zona de comercialización.

Sin embargo, en el caso de la humedad ambiental, la relación con la estabilidad de un medicamento es más compleja, ya que depende de la forma farmacéutica y del material de acondicionamiento utilizado. Por este motivo, el ICH especifica que en el caso de medicamentos líquidos envasados en envases semipermeables se ha de determinar el período de validez en condiciones de humedad relativa más desfavorables: ambientes de baja humedad relativa donde se favorece la pérdida de agua del medicamento.

El documento, sin embargo, no hace ninguna referencia a las formas farmacéuticas sólidas envasadas en envases semipermeables, cuyo contenido en humedad y, como consecuencia, otras muchas propiedades del medicamento como disgregación, friabilidad, contenido en microorganismos..., e incluso potencia o disolución del principio activo, puede modificarse cuando se conservan en ambientes de diferente humedad relativa. Así, por ejemplo, comprimidos estables a una humedad relativa del 60 % pueden presentar problemas de disolución del principio activo cuando se conservan a una humedad relativa del 40 %, debido a la pérdida de agua; o pueden manifestar una intensa degradación del principio activo o un reblandecimiento de la forma farmacéutica por captación de agua si se conservan en ambientes de humedad relativa superior al 70 % (6).

Estas situaciones no son improbables: analizando los valores climatológicos en España durante el período de 1961-1990 (7), se observa que en ciudades como Santiago de Compostela, La Coruña, Gijón, San Sebastián, Tarifa o Ceuta, la humedad relativa ambiental fue superior al 75 % durante todo el año; mientras que en ciudades como Cáceres o Madrid, durante los meses de julio y agosto la humedad relativa ambiental fue inferior al 40 %. Esta última situación, esto es, la conservación de medicamentos en ambientes de humedad relativa inferior al 40 %, es aún más probable si se tiene en cuenta que en el interior de los edificios la utilización de la calefacción, en invierno, y del aire acondicionado, en verano, produce una significativa reducción de la humedad ambiental. En un estudio realizado en nuestro laboratorio durante dos años, se comprobó que la humedad relativa ambiental media fue tan sólo del

35,5 %, con una mínima del 28,5 % y una máxima del 51 %; mientras que los valores ambientales en el exterior oscilaron entre el 39 y el 73 % con una media del 56 %, valor similar al 60 % propuesto por el ICH para la realización de los estudios de estabilidad.

Comercialización en las zonas climáticas III y IV

El ICH también propone unas condiciones únicas para el almacenamiento de las muestras en los estudios de estabilidad de medicamentos que se vayan a comercializar en cualquiera de estas dos zonas climáticas: 30° C y 65 % de HR. Se vuelve a especificar que, en el caso de medicamentos líquidos envasados en envases semipermeables, se ha de determinar el período de validez en condiciones de humedad relativa más desfavorables: ambientes de baja humedad donde se favorece la pérdida de agua del medicamento. A diferencia con el documento referido a las zonas I y II, el ICH en este caso contempla la necesidad de realizar estudios adicionales a una humedad relativa mayor (80 %) en el caso de medicamentos sólidos en envases semipermeables que se vayan a comercializar en la zona climática IV, ya que la humedad media ambiental (70 %) es superior a la propuesta para el estudio (65 %). Sin embargo no considera la necesidad de estudios a baja humedad en el caso de sólidos que se van a comercializar en la zona climática III (con una humedad ambiental media del 35 %), aunque, en el caso de los sólidos, puede ser tan nociva su conservación en ambientes de elevada humedad ambiental como en ambientes de baja humedad ambiental (fenómeno que no ocurre con la temperatura de conservación).

Por tanto, en los documentos elaborados por el ICH no se consideran necesarios estudios adicionales a baja humedad relativa en el caso de sólidos en envases semipermeables, y únicamente se consideran necesarios estudios adicionales a elevada humedad relativa en el caso de sólidos en envases semipermeables que se vayan a comercializar en la zona climática IV.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD QUÍMICA DE COMPRIMIDOS DE VITAMINA C ENVASADOS EN BLISTERS DE PVC

Método

El estudio se realiza con tres lotes de comprimidos con 500 mg de vitamina C (productos Rekah). Las condiciones de almacenamiento son las generales recogidas por el ICH: 25° C y 60 % de humedad relativa (HR) para el estudio a largo plazo, y 40° C y 75 % HR para el estudio acelerado. Para evaluar la influencia de la humedad ambiental se incluye una condición acelerada más: 40° C, pero con la misma HR que el estudio a largo plazo: 60 % HR.

Con los datos obtenidos a 40° C se extrapolan dos valores de período de validez. Para ello se utiliza un FPE de 1,71, calculado para una E_a de 27,7 KJ/mol, valor obtenido mediante tratamiento isotérmico de los comprimidos de vitamina C y aplicando la ecuación de Arrhenius. A partir del FPE y del valor de constante de velocidad de degradación máxima a 40° C, se estima una constante de velocidad de degradación a 25° C y a partir de ella se estima el valor de $t_{90\text{mínimo}}$, que se corresponderá con el período de validez.

Estos dos valores se comparan con el valor de período de validez obtenido a partir de los datos del estudio a largo plazo, que se tratan matemáticamente de acuerdo al procedimiento descrito por el ICH.

Resultados

La figura 1 muestra la evolución de la cantidad remanente de vitamina C en los comprimidos con el paso del tiempo en todas las condiciones de almacenamiento.

Desde el punto de vista estadístico, no se puede discernir cuál es el modelo cinético al que mejor se ajustan los datos experimentales, por lo que, de acuerdo a datos bibliográficos, se ajustan a una cinética de primer orden.

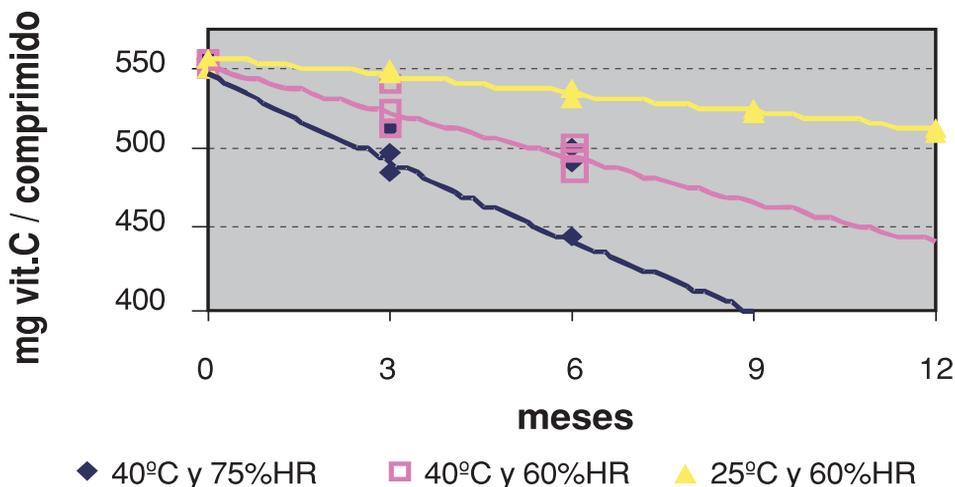


FIGURA 1. Perfiles de estabilidad de los comprimidos de vitamina C

En ninguno de los estudios acelerados se pudo verificar la homogeneidad entre lotes, por lo que el cálculo de la constante de velocidad de degradación (K_{40}) se realiza con los datos del lote más inestable. Por el contrario, en el caso del estudio a largo plazo se tratan los datos de los tres lotes globalmente (Tabla 5).

TABLA 5. Cálculo del período de validez

	40° C 75%HR	40° C 60%HR	25° C 60%HR
K (mes ⁻¹)	0,0357	0,0129	0,0069
S_k (mes ¹)	0,0027	0,0033	0,0003
$t_{90min.}$ (meses)	4,22	8,43	12,82

Se observa que para un mismo período de tiempo (seis meses), y con la misma temperatura de almacenamiento (40° C), la constante de degradación obtenida con una HR del 75 % (según ICH) es el doble a la obtenida con el 60 % HR.

Además, el estudio de estabilidad acelerado, siguiendo la normativa ICH, esto es, a una humedad relativa del 75 %, no sirve para

apoyar los resultados obtenidos a largo plazo, cuando se evalúan comprimidos de vitamina C. Sin embargo, cuando se trabaja en condiciones aceleradas de temperatura sin cambiar la HR, es decir, a 40° C y 60 % HR, se consigue una mayor aproximación a lo obtenido en el estudio a largo plazo.

Por lo tanto, se demuestra que para medicamentos sensibles a la HR ambiental, como los comprimidos de vitamina C, no se pueden relacionar datos obtenidos a distintas HR, como propone la normativa ICH.

CONCLUSIÓN

En la normativa elaborada por el ICH, para realizar estudios de estabilidad de medicamentos, no se contempla el efecto que pudiera tener una mayor o una menor humedad ambiental sobre la estabilidad física y química de medicamentos sólidos en envases semipermeables. A través de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de comprimidos de vitamina C, se ha comprobado que los comprimidos almacenados a una humedad ambiental mayor presentaron una degradación significativamente mayor; y que los estudios de estabilidad acelerados carecen de capacidad para apoyar extrapolaciones a largo plazo, si no se realizan en las mismas condiciones de humedad que los estudios a largo plazo.

Sería conveniente, en una futura revisión de la directriz principal sobre los estudios de estabilidad elaborada por el ICH, incorporar la necesidad de realizar un estudio a diferentes humedades relativas (una superior y otra inferior a la propuesta en las «condiciones de almacenamiento de las muestras») sobre, al menos un lote, en el caso de medicamentos sólidos en envases semipermeables.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (febrero 2003). «Stability Testing Of New Drug Substances And Products (Revision 2)», ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q1A(R2) (CPMP/ICH/2736/99).
- (2) INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (febrero 2003). «Stability Data Package for Registration in Climatic Zones III and IV». ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q1F (CPMP/ICH/421/02).

- (3) WHO (1996). «Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well Established Drug Substances in Conventional Dosage Forms». *WHO Technical Report Series*, n.º 863, Annex 5.
- (4) WHO (2001). Report of the thirty seventh meeting of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (October 2001) Ginebra, págs. 22-26.
- (5) GRIMM, W. (1993). «Storage Conditions For The Most Important Market For Drug Products, Including The EU, Japan And The USA». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 19, págs. 2795-2830.
- (6) BRAHMAIAH, K. & RHODES, C. T. (1999). «Trends In Stability Testing, With Emphasis On Stability During Distribution And Storage». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25(7), págs. 857-868.
- (7) INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA (1991). *Guía Resumida del Clima en España, 1961-1990*. Centro de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.

La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal (*)

ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

La exocitosis es el mecanismo por el que las células liberan los mensajeros extracelulares (hormonas y neurotransmisores) que almacenan en compartimentos membranosos (vesículas y gránulos de secreción). Se trata de un proceso, habitualmente regulado por la concentración citosólica de Ca^{2+} , que conlleva la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática. En los últimos años, la utilización de técnicas bióficas, genéticas y de biología molecular ha posibilitado un avance sustancial en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la exocitosis. En el presente artículo se revisa el papel que algunas proteínas podrían jugar en la exocitosis regulada en las células cromafines de la médula adrenal, un modelo celular ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción.

Palabras clave: Exocitosis.—Célula cromafín.—SNARE.—Sinaptotagmina.—Neurosecretion.

ABSTRACT

Ca^{2+} -triggered exocytosis of neurotransmitter or hormones stored in membrane-bound organelles (secretory vesicles and granules) forms the basis of cell-to cell communication in multicellular animals. The exocytotic release of signalling molecules proceeds through the fusión of the secretory vesicle membrane with the plasma membrane. In recent years, the twinning of techniques from biophysics,

(*) Toma de Posesión como Académico Correspondiente, día 15 de abril de 2004.

genetics and molecular biology has led to a remarkable advancement in our understanding of molecular mechanisms of exocytosis. Here, I review recent studies on a simple cellular model widely used in neurosecretion research, the adrenal chromaffin cell, and discuss the specific roles in different steps of the exocytotic process that has been assigned to several synaptic proteins.

Key words: Exocytosis.—Chromaffin cell.—SNARE.—Synaptotagmin.—Neurosecretion.

EXTENSIVE ABSTRACT

Molecular determinants of exocytosis in adrenomedullary chromaffin cells

Cell to cell communication provides the basis of functional integration in multicellular organisms. This process makes use of extracellular messengers—neurotransmitters and hormones—that are released by the cells in response to a wide range of stimuli. A paradigmatic example of intercellular communication is that occurs at the synapses between two neurons. The preynaptic side of this structure is contributed by the nerve ending where the transmitter is stored in discrete amounts—known as quanta—inside membrane vesicles. Communication is mediated by the release of the transmitter into the synaptic cleft and the subsequent activation of specific receptors located on the plasma membrane of the postsynaptic cell. The mechanism by which transmitters are released is the exocytosis, which implies the fusion of the plasma membrane with the vesicle membrane and the establishment of a diffusional pathway between the vesicle interior and the extracellular space. Only a fraction of the vesicles that are in physical contact—docked—with the plasma membrane are competent—primed—for being exocytosed, a phenomenon that is triggered or accelerated by a rise in the intracellular free Ca^{2+} concentration. The purpose of this review is to describe the molecular machinery, mostly composed of proteins, involved in the last steps of the exocytotic process: vesicle docking, vesicle priming and fusion of the vesicle membrane with the plasma membrane. On each of these steps, a set of three proteins play a central role: Synaptobrevin, a vesicle-associated membrane protein—also known as VAMP—, and two plasma membrane proteins, syntaxin and SNAP25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa). These three proteins form the so-called fusion complex, which binds to two soluble proteins, NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) and α -SNAP (soluble NSF attachment protein). Since α -SNAP directly interacts with synaptobrevin, syntaxin and SNAP25, these proteins are commonly referred to as SNAP receptors or SNARES. NSF, α -SNAP and SNARES constitute a molecular apparatus that has been conserved through the evolutionary scale and is essential to any process of membrane fusion. NSF acts as an ATPase whose activity is stimulated by α -SNAP leading to fusion complex disassembly. Moreover, continuous formation and disruption of the fusion complex is an intrinsic feature to the SNARE functioning in membrane trafficking.

Chromaffin cells from the adrenal medulla are neural crest derivatives that synthesize and store catecholamines inside large dense-core granules, the chromaffin granules. Catecholamines are released into the blood stream by a typically exocytotic mechanism, with a well-characterised intracellular Ca^{2+} dependence. Similarly to other neuroendocrine cells, adrenomedullary chromaffin cells express most of the proteins that have been involved in synaptic exocytosis. Chromaffin cells are a simple cellular model widely used in neurosecretion research due to the ease of culture from normal and also from genetically modified animals, and their amenability to the employment of biophysical techniques for the study of exocytosis with millisecond resolution. These techniques include the patch-clamp, which allows the measurement of cell capacitance changes as an assay of exocytosis, and flash photolysis of caged- Ca^{2+} compounds (DM-nitrophen, nitrophenil-EGTA), which is able to instantaneously increase (< 1 ms) cytosolic Ca^{2+} in the cell in a spatially homogeneous manner. The chromaffin cell exocytotic response to photorelease of Ca^{2+} ($\sim 20 \mu\text{M}$) comprises two kinetically different components: a phasic component, occurring during the first second after intracellular Ca^{2+} elevation, and a tonic or sustained component that follows the phasic one over tens of seconds. Phasic release would result from the exocytosis of mature vesicles whereas the sustained component would reflect the maturation process (priming) and the subsequent exocytosis of vesicles as long as Ca^{2+} remains elevated. By using specific reagents (clostridial toxins, antibodies, peptides, etc.) against the proteins of the secretory machinery it is possible to interfere selectively with each of these two components, thereby relating vesicle pools in distinct functional states with certain synaptic proteins. Recent evidence involving SNARES, Munc18-1 and synaptotagmin I in specific steps of the exocytotic process from chromaffin cells is summarised at the end of this review.

INTRODUCCIÓN

La comunicación intercelular es la base de la integración funcional en los organismos superiores. Este proceso emplea mensajeros extracelulares —hormonas y neurotransmisores— que son liberados por las células en respuesta a múltiples estímulos. Un ejemplo paradigmático de comunicación intercelular es el que acontece en el tejido nervioso. La comunicación entre sus células parenquimatosas, las neuronas, tiene lugar en regiones especializadas denominadas sinapsis, en las que la terminación nerviosa de una neurona entra en contacto con la membrana de otra. En las terminaciones nerviosas el neurotransmisor se almacena en cantidades discretas, denominadas cuantos, en el interior de vesículas membranosas desde las que accede a la hendidura sináptica mediante el mecanismo de la exoci-

tosis (1). La exocitosis implica la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el espacio intersticial. El transmisor así liberado se combinará con receptores de la membrana de la neurona postsináptica, generando corrientes iónicas, excitadoras o inhibitorias, que se pueden registrar electrofisiológicamente y cuya amplitud es función lineal del número de cuantos de transmisor liberado, dependiente, a su vez, del número de vesículas que se fusionan con la membrana de la terminación nerviosa (2, 3).

La exocitosis constituye un caso particular de lo que se conoce como tráfico de membranas de las células eucarióticas que conlleva la formación y utilización de pequeñas vesículas de membrana (4, 5). Existe amplia evidencia bioquímica y morfológica de que con la exocitosis no finaliza el ciclo vital de las vesículas sinápticas sino que éstas son recicladas intracelularmente una vez que su membrana es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (6). Dentro de la célula, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que, en cuestión de segundos, se forman nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular (7). Algunas de estas vesículas entran en contacto físico (atraque, anclaje o «docking») con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración («maturation» o «priming») que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración de Ca^{2+} , habitualmente como consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas (Figura 1) (8). El objetivo de este artículo es el de describir funcionalmente la maquinaria molecular, fundamentalmente de naturaleza proteica, responsable de las tres últimas etapas del proceso secretor de neurotransmisores: el atraque de las vesículas a la membrana, la maduración vesicular para adquirir competencia secretora y la fusión de membranas o exocitosis propiamente dicha.

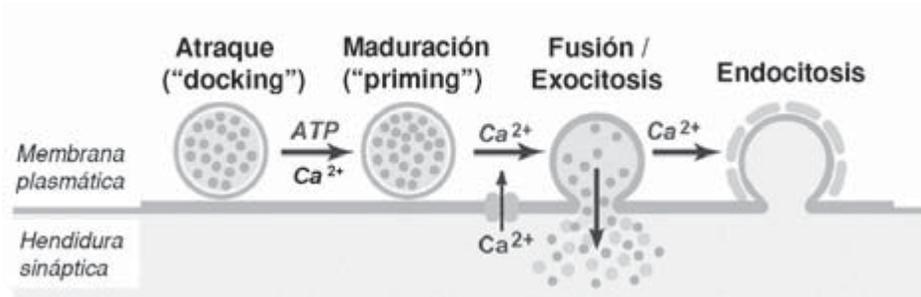


FIGURA 1. *Etapas del ciclo de las vesículas sinápticas inmediatamente anteriores y posteriores a la exocitosis. El ciclo vital de las vesículas sinápticas no finaliza con la exocitosis (fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática; etapa 3) sino que las vesículas son recicladas intracelularmente, una vez que la membrana vesicular es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (etapa 4). Dentro de la célula, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que se formarán nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular. Algunas de estas vesículas entran en contacto físico («docking», etapa 1) con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración («priming», etapa 2) que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración de Ca^{2+} , como consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas. El proceso de maduración vesicular y la endocitosis también son regulados por los niveles intracelulares de Ca^{2+} .*

LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE FUSIÓN

La membrana vesicular alberga más de diez familias de proteínas diferentes (Tabla 1) (9). Queda fuera de los objetivos de esta revisión siquiera la mera reseña de todas ellas. Baste indicar que algunas, como la SV2, resulta esencial para el transporte de Ca^{2+} al interior de las vesículas (10); otras, como las sinapsinas, median la interacción de las vesículas con el citoesqueleto (11), lo que pudiera estar relacionado con los fenómenos de reclutamiento y translocación vesicular durante la estimulación prolongada, mientras que otras participarían en los procesos de maduración vesicular y de fusión de membranas. Entre estas últimas, deseo mencionar a la sinaptobrevina —también llamada VAMP, acrónimo de «vesicle-associated

membrane protein»—, una proteína integral de la membrana vesicular que forma parte del complejo de fusión (12), y a la sinaptotagmina, que desde hace algunos años es considerada el receptor de Ca^{2+} en la exocitosis regulada (13, 14, 15).

TABLA 1. *Proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas y de los gránulos de secreción (28)*

<i>Proteínas comunes</i>	<i>Proteínas específicas de los gránulos</i>	<i>Proteínas específicas de las vesículas sinápticas</i>
Sinaptofisinas	Amidasa de péptidos	Sinapsinas
Synapogirinas	Citocromo b561	
Rab3A,B y C	Peptidasas (PC1, PC2, CPE, etc.)	
Sinaptotagmina 1y 2	IA-2/fogrina	
SV2		
SVOP		
SCAMPS		
Sinaptobrevinas		
CSP («Cysteine string protein»)		
Bomba de protones		
Transportador de cloro		
Transportador de zinc (algunas vesículas)		

El denominado complejo de fusión está formado por la sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25 («synaptosome-associated protein of 25 kDa») (16). Estas proteínas se asocian *in vitro* para formar un complejo ternario 7S, en relación a la velocidad con la que sedimenta al ser centrifugado. Al complejo 7S se unen dos proteínas solubles, el NSF («N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein») y α -SNAP («soluble NSF attachment protein»), originando el llamado complejo 20S (17) (Figura 2A). Dado que α -SNAP debe unirse al complejo 7S antes de que NSF pueda hacerlo, las proteínas de dicho complejo son conocidas como «SNAP receptors» o SNAREs. Además, y a tenor de su localización preferente en las distintas membranas destinadas a fusionarse, se denominan v-SNAREs («vesicle

SNAREs») a las proteínas del complejo que, como la sinaptobrevina, se sitúan en la membrana de las vesículas, mientras que aquellas que pertenecen a la membrana plasmática reciben el nombre de t-SNAREs («target SNAREs»). El NSF, las SNAPs y las SNAREs forman parte de una maquinaria molecular que se ha preservado a lo largo de la escala evolutiva y que resulta esencial para los procesos de fusión de membranas (18). El NSF es una ATPasa cuya actividad hidrolítica es estimulada por α -SNAP y resulta necesaria para el desensamblaje del complejo de fusión. Por otra parte, la continua formación y ruptura del mismo constituye una propiedad inherente al funcionamiento de las SNAREs en el tráfico de membranas (19).

Estudios de microscopía electrónica combinada con inmunofluorescencia han revelado la topología del complejo ternario 7S (20). Las tres SNAREs se asocian entre sí siguiendo una orientación en paralelo con los dominios carboxilo-terminales de anclaje a la membrana disponiéndose contiguamente en el mismo extremo del complejo. Es importante señalar que esta orientación permitiría la formación de complejos entre proteínas situadas en la misma membrana (configuración cis) sobre los que actuaría el NSF para generar monómeros de SNAREs. Las SNAREs así liberadas reconstituirían nuevos complejos también entre membranas destinadas a fusionarse entre sí (ensamblaje productivo o en configuración trans). La energía liberada en la formación del complejo serviría para aproximar las dos membranas venciendo la barrera de energía generada por las cargas negativas de los fosfolípidos. Asimismo, la estructura cristalina del complejo ternario ha podido ser establecida mediante difracción de rayos X (21). El complejo de fusión adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1 nm = 10 Å) de longitud y diámetro transversal variable (Figura 2B). La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las tres proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNARE. La syntaxina y la sinaptobrevina poseerían un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contendría dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. El ensamblaje comenzaría por la formación de

un complejo binario entre la sintaxina y SNAP-25 y continuaría mediante la asociación a ellas de la sinaptobrevina. La interacción se establecería inicialmente entre los dominios amino-terminales, que son los más distantes a la membrana, e iría avanzando mediante el entrecruzamiento (trenzado) de las regiones SNARE en dirección a las zonas de inserción en la membrana de la sinaptobrevina y la sintaxina.

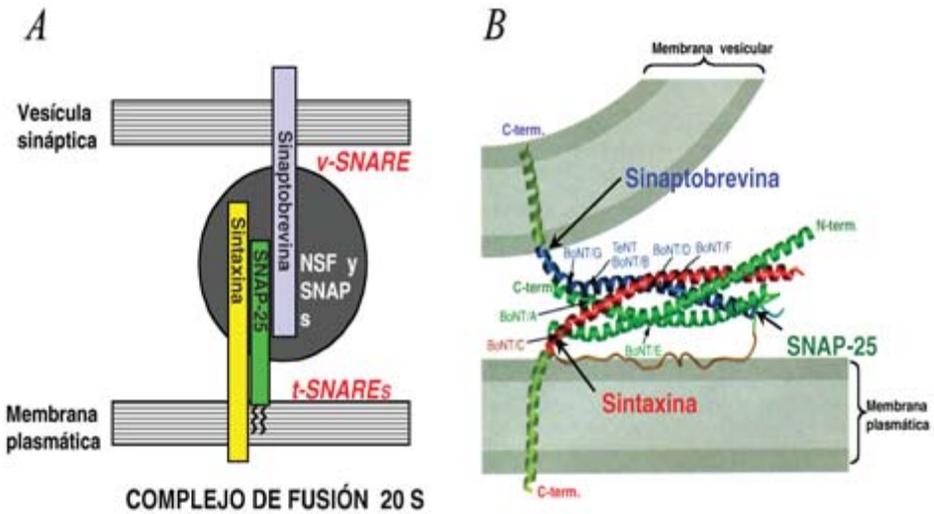


FIGURA 2. El complejo proteico de fusión de membranas. A) Representación esquemática del complejo de fusión. El complejo está formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la sintaxina y SNAP-25 («synaptosome associated protein of 25 kDa»). Estas proteínas se asocian in vitro formando un complejo ternario 7S al que se unen dos proteínas solubles, el NSF («N-ethylmaleimide sensitive fusion protein») y α -SNAP («soluble NSF attachment protein»), originando el llamado complejo 20S. B) Estructura tridimensional del complejo de fusión obtenida mediante análisis de difracción de rayos X (21). El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1 nm = 10 Å) de longitud y diámetro transversal variable. La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las tres proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNAREs. La sintaxina y la sinaptobrevina poseen un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contiene dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT) A, B, C, D, E, F y G.

LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA MÉDULA ADRENAL COMO MODELO EXPERIMENTAL EN ESTUDIOS SOBRE LA NEUROSECRECIÓN

La médula adrenal constituye la porción central de la glándula adrenal de los mamíferos, siendo una estructura neuroendocrina que funcionalmente se integra dentro del sistema nervioso autónomo y que puede considerarse como un ganglio simpático modificado. El parénquima de la médula adrenal lo forman las células cromafines que almacenan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en el interior de gránulos citoplásmicos denominados cromafines por su afinidad por las sales de cromo, que les confieren una coloración amarillo parduzca al microscopio óptico. Las catecolaminas son liberadas al torrente circulatorio en situaciones de estrés por un mecanismo típicamente excitotósico (22, 23). A este respecto, cabe señalar que en las células cromafines —al igual que en otras células neuroendocrinas— se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas que han sido identificadas en las terminaciones sinápticas (Tabla 1) (24, 25, 26, 27, 28). El acoplamiento excitación-secreción se inicia cuando las moléculas de acetilcolina procedentes de las terminaciones de las fibras preganglionares del nervio esplácnico se combinan con receptores nicotínicos o muscarínicos de la membrana celular. La activación de los primeros da lugar a una despolarización de la membrana celular que se sigue de la descarga de potenciales de acción debidos tanto a la apertura de canales de Na^+ como de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con la consiguiente elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} que es la señal que desencadena la exocitosis (29).

La preparación de médula adrenal habitualmente empleada en los estudios de neurosecreción son las células cromafines aisladas. Las células cromafines son fácilmente obtenibles por digestión enzimática, adoptando una morfología esférica en cultivo, lo que facilita enormemente la aplicación de técnicas biofísicas capaces de medir la exocitosis en la escala de tiempo de los milisegundos, que es en la que este fenómeno se produce en los seres vivos. Entre estas técnicas destaca la electrofisiológica del «patch-clamp», que en su configuración de célula completa permite fijar el potencial de membrana y, eventualmente, registrar las corrientes eléctricas generadas por el flujo de iones a través de los canales de la práctica totalidad de la membrana celular (30). Esta configuración posibilita también el con-

trol de la composición del citoplasma celular y la adición al mismo, vía diálisis desde la pipeta de registro, de sondas fluorescentes como el fura-2, el fura-4, el furaptra y otras varias que permitirán la monitorización de la concentración citosólica de Ca^{2+} (31). La técnica del «patch-clamp» permite también el estudio de la exocitosis de forma directa mediante la medida de los cambios de la capacitancia celular (32). Como ya ha sido mencionado, la exocitosis consiste en la fusión de la membrana vesicular con la plasmática, lo que conlleva, aunque sólo sea de manera transitoria, el incremento de la superficie de esta última. Las membranas biológicas están constituidas por una bicapa lipídica cuyas caras están en contacto con soluciones salinas. Ello determina que se comporten eléctricamente como condensadores en los que la capacitancia o capacidad es directamente proporcional al área de la superficie conductora. Por consiguiente, la exocitosis se traducirá en un incremento de la capacitancia de la célula, cuyos cambios pueden medirse con exquisita sensibilidad —puede detectarse la fusión de dos o tres gránulos cromafines— y resolución temporal —del orden de 1 ms— empleando esta técnica. Esta técnica, capaz de medir la respuesta secretora con tan elevada precisión, debe ser complementada con procedimientos que consigan elevar rápidamente la concentración de Ca^{2+} intracelular. Este objetivo se logra mediante la fotoliberación de Ca^{2+} desde compuestos como el DM-nitrofenil y el nitrofenil-EGTA (33). A diferencia de la señal de Ca^{2+} citosólica generada por la despolarización de la membrana celular, la fotoliberación de Ca^{2+} origina un incremento instantáneo (<1 ms) y espacialmente homogéneo de la concentración de calcio intracelular, posibilitando además la monitorización continua de la respuesta exocitósica a través de los cambios de la capacitancia celular (Figura 3A) (34). En la respuesta secretora de las células cromafines a la fotoliberación de Ca^{2+} es posible distinguir dos componentes cinéticos: el componente fásico, que tiene lugar durante el segundo siguiente al incremento de la concentración de Ca^{2+} , y el tónico o sostenido que sucede al anterior (Figura 3B). De acuerdo con el modelo lineal del proceso secretor ya presentado, la respuesta fásica sería el resultado de la liberación de un contingente de vesículas maduras o dotadas de competencia secretora, mientras que el componente tónico reflejaría el proceso de maduración de las vesículas y la subsiguiente exocitosis de las mismas en tanto que permanezca elevada la concentración de Ca^{2+} intracelular. Los datos a los que haré

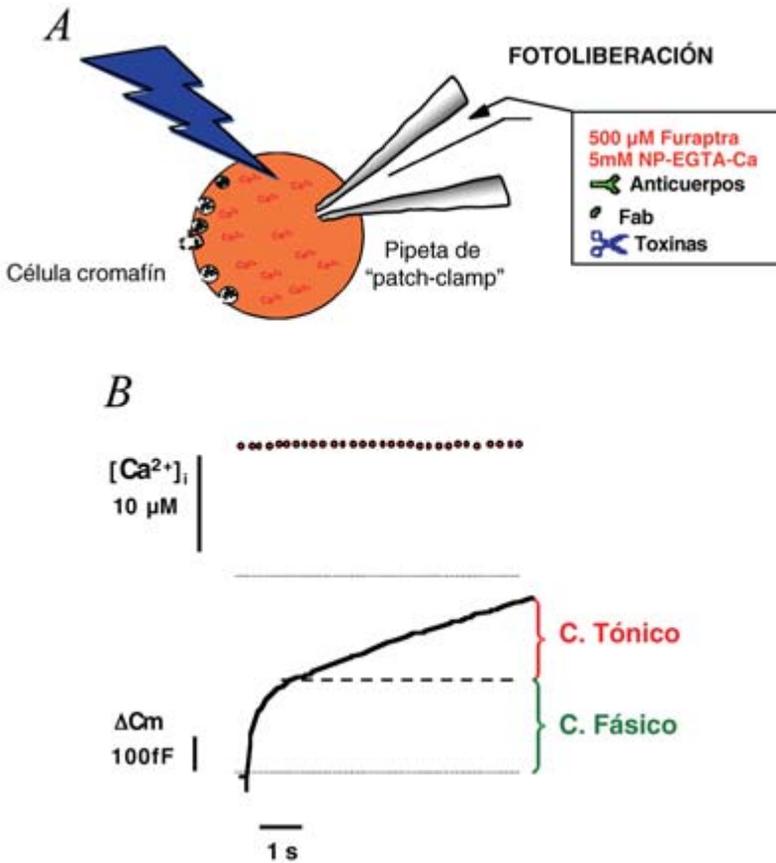


FIGURA 3. Esquema del abordaje experimental empleado para el estudio de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. A) Se muestra una célula cromafín en la configuración de célula entera de la técnica de «patch-clamp». En esta configuración, la pipeta de registro posibilita la introducción en el interior celular de indicadores fluorescentes de la concentración citosólica de Ca^{2+} (Fura-2, Fura2), quelantes de Ca^{2+} fotosensibles (NP-EGTA) y reactivos específicos (anticuerpos, toxinas clostridiales, péptidos, etc.) para las distintas proteínas sinápticas. La fotoliberación de Ca^{2+} da lugar a un aumento homogéneo en la concentración citosólica de dicho catión. B) Cambio en la capacitancia de la membrana de una célula cromafín (panel inferior) en respuesta a la fotoliberación de Ca^{2+} que eleva la concentración citosólica del mismo hasta 10-20 μM (panel superior). Es posible distinguir dos componentes cinéticos en la respuesta de capacitancia: el componente fásico, que tiene lugar durante el segundo siguiente al incremento de la concentración de Ca^{2+} , y el tónico o sostenido, que sucede al anterior. Véase el texto para hallar una explicación sobre el significado funcional de ambos componentes.

referencia a continuación ilustran los esfuerzos que se están llevando a cabo actualmente en distintos laboratorios, y en particular en el del Profesor E. Neher en Gotinga, para esclarecer el significado funcional en la exocitosis de distintas proteínas sinápticas. Este tipo de estudios se vale de la introducción en las células desde la pipeta de «patch-clamp», juntamente con indicadores fluorescentes de baja afinidad para el Ca^{2+} (furaptra), de reactivos que específicamente interactuarán con dichas proteínas y se basa en el análisis de los cambios que se producen el patrón de la respuesta de capacitancia ya descrito. El propósito último de estos trabajos es el de relacionar los distintos componentes cinéticos de la respuesta excitotóxica, indicativos de la existencia de poblaciones de vesículas en estados funcionales distintos, con entidades o complejos moleculares de la maquinaria secretora (35).

LA MAQUINARIA MOLECULAR DE LA EXOCITOSIS EN LAS CELULAS CROMAFINES

El primer aspecto al que me referiré versa sobre un elemento clave de la hipótesis SNARE que postula la intervención generalizada de α SNAP y NSF en los procesos de fusión intracelular de membranas. En su formulación inicial, la hipótesis SNARE consideraba que el ensamblaje del complejo ternario inducido por NSF era el desencadenante último —proveía la energía necesaria— del proceso de fusión de membranas. Sin embargo, la diálisis intracelular de α SNAP da lugar a un incremento de los componentes fásico y tónico de la respuesta excitotóxica inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} en las células cromafines, sin modificar la cinética del componente fásico. Ello sugiere que α -SNAP interviene en las etapas iniciales del proceso secretor. En consonancia con estos resultados, la N-etilmaleimida (NEM), un agente que bloquea la actividad ATPásica del NSF al impedir su unión al complejo ternario, produce una reducción selectiva del componente tónico de la respuesta excitotóxica (36, 37).

El segundo elemento fundamental de la hipótesis SNARE hace referencia a las proteínas integrantes del complejo de fusión. Las toxinas clostridiales son neurotoxinas paralizantes producidas por distintas cepas del género clostridium. Se comportan como protea-

sas que hidrolizan enlaces específicos de las distintas SNAREs. A este respecto, conviene mencionar que la identificación de estas proteínas como las dianas de las toxinas clostridiales constituyó la primera evidencia que asoció a las SNAREs con la exocitosis (38, 39, 40, 41). Los enlaces peptídicos hidrolizados por las toxinas se encuentran entre los extremos carboxilo-terminales (de inserción de la sinaptobrevina y la syntaxina a la membrana) de las SNAREs y la porción media del complejo de fusión (Figura 2B). Sólo los monómeros de SNAREs o el complejo ternario parcialmente ensamblado («loose complex»; SRP, ver más adelante), en el que las hélices alfa próximas a los extremos carboxilo-terminales se encuentran separadas, son susceptibles a la acción de las toxinas (42). Tanto la toxina tetánica como las botulínicas B, D, F y G, que actúan sobre la sinaptobrevina, como la botulínica C que hidroliza la syntaxina, ocasionan la separación de la membrana vesicular o plasmática, respectivamente, del complejo de fusión, impidiendo así que sirva de puente que aproxime las dos membranas. Por su parte, las toxinas botulínicas A y E actúan sobre el extremo carboxilo-terminal de SNAP-25, que no interviene en el anclaje de esta proteína a la membrana. Por ello, su efecto se atribuye a la desestabilización del complejo de fusión en su región carboxilo-terminal (43). Estas sustancias eliminan completamente la respuesta tónica inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} , produciendo inicialmente un efecto mucho menor sobre la respuesta fásica. Su efecto se explicaría tanto porque las toxinas actúan sobre las formas monoméricas de las SNAREs impidiendo su participación en la formación de complejos de fusión (supresión del componente tónico), como porque el estado parcialmente ensamblado de éstos sería también sensible a la acción de las toxinas (reducción del componente fásico). El efecto de la toxina botulínica A difiere de este patrón, ya que al eliminar sólo los últimos nueve aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de SNAP-25 —que tampoco forman parte del dominio SNARE de esa proteína— esta toxina ocasionaría la desestabilización del complejo completamente ensamblado, lo que conllevaría exclusivamente la pérdida del componente rápido de la respuesta fásica («tight complex»; RRP, ver más adelante) (44).

Como resultado de este tipo de experimentos es posible concluir que α -SNAP y NSF intervienen en etapas tempranas del proceso

secretor, deshaciendo los complejos de fusión en configuración cis (más estables termodinámicamente) que se forman entre proteínas situadas en la misma membrana (Figura 4). La rotura de dichos complejos catalizada por la hidrólisis del ATP rinde monómeros de SNAREs altamente energizados que se asociarán entre sí para formar complejos ternarios en configuración trans. Se considera que la energía almacenada en la distorsión de las SNAREs en las zonas próximas a su inserción en las membranas constituye un elemento esencial para promover la fusión. Por ello, son las vesículas que incorporan complejos en esta configuración las que presentan competencia secretora, que se alcanzará en función de la disponibilidad de monómeros de SNAREs, lo que a su vez está condicionado por la indemnidad de los mismos —se da en circunstancias normales de ausencia de toxinas clostridiales— y por la actividad de α -SNAP y NSF. Ambos factores, disponibilidad de monómeros de SNAREs y actividad de α -SNAP y NSF determinarán la velocidad del componente tónico o sostenido de la respuesta excitósica (45).

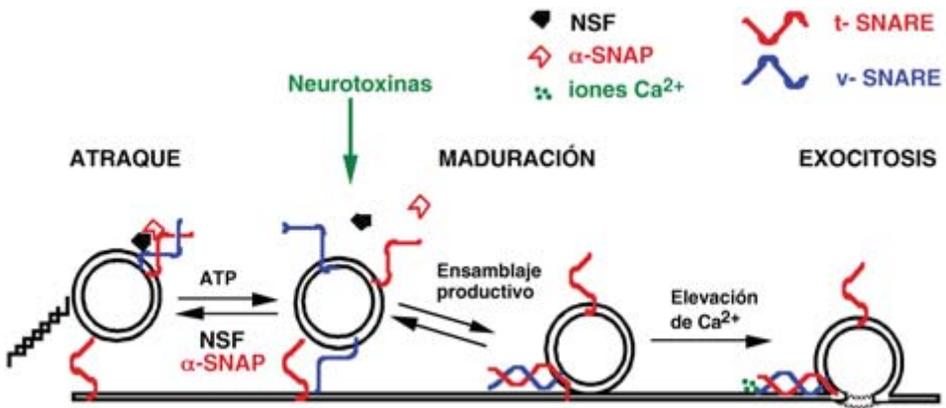


FIGURA 4. Lugar de acción de α -SNAP y NSF en el ciclo vesicular. El proceso de maduración vesicular para la adquisición de competencia secretora implica la formación de complejos ternarios entre SNAREs situadas en membranas destinadas a fusionarse (configuración trans; ensamblaje productivo). α -SNAP y NSF intervienen en etapas tempranas de la exocitosis deshaciendo los complejos en configuración cis, que se forman entre SNAREs situadas en la misma membrana. Las toxinas clostridiales actúan sobre formas libres de las SNAREs.

La formación del complejo de fusión no constituye un requisito para el atraque («docking») de las vesículas a la membrana plasmática, ya que éste se sigue produciendo —en base a valoraciones morfológicas mediante microscopía electrónica— en células procedentes de ratones «knock-out» para el gen de SNAP-25 (46). En esta función de conectar físicamente las vesículas de secreción a la membrana plasmática parece participar la proteína Munc18-1 (47). Se trata de una proteína citosólica que posee una elevada afinidad para unirse a la syntaxina cuando se haya en forma libre, no formando parte del complejo de fusión. Las células cromafines obtenidas de ratones deficientes en Munc18-1 presentan una reducción de la amplitud de la respuesta secretora debida a la disminución del número de gránulos cromafines situados en contacto con la membrana celular. Por el contrario, la sobrexpresión de Munc18-1 en estas mismas células se asocia a un aumento tanto en el componente fásico como tónico de la respuesta secretora inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que Munc18-1 promueve el atraque de las vesículas a la membrana celular previamente a la formación del complejo de fusión (48).

Si bien las toxinas clostridiales han sido herramientas farmacológicas de altísimo valor en el estudio de la exocitosis, presentan el inconveniente de su toxicidad potencial para el investigador y, sobre todo, el de actuar sobre un número relativamente reducido de localizaciones intramoleculares. Por ello, el empleo de anticuerpos —y de sus fragmentos Fab— dirigidos contra epítomos seleccionados por el investigador puede ofrecer importantes ventajas en la caracterización de los dominios funcionalmente relevantes de las proteínas SNARE. La cinética de unión de algunos anticuerpos a su dianas puede ser lenta, precisándose un tiempo de contacto entre ambos relativamente prolongado (> 30 min) y, en todo caso, superior al que puede mantenerse una célula en la configuración de célula completa de la técnica de «patch-clamp». En circunstancias como ésta en las que sea necesario evaluar los efectos de moléculas que actúan lentamente sobre la exocitosis, es preferible recurrir a un abordaje experimental diferente al descrito (Figura 5). En este caso, tanto la molécula en cuestión como algún indicador fluorescente de Ca^{2+} son también introducidos en la célula cromafín vía una pipeta de «patch-clamp» en la configuración de célula completa, si bien posterior-

mente se retira la pipeta y se inicia la estimulación de la célula mediante la aplicación de pulsos de 500 ms de acetilcolina, que se administra iontoforéticamente. Durante la estimulación se procede al registro de la señal citosólica de Ca^{2+} y de la actividad secretora medida por amperometría. La posibilidad de aplicar esta técnica constituye otra de las ventajas que el empleo de células cromafines aporta al estudio de la neurosecreción. Mediante la amperometría se mide la corriente eléctrica generada por la oxidación de las cateco-

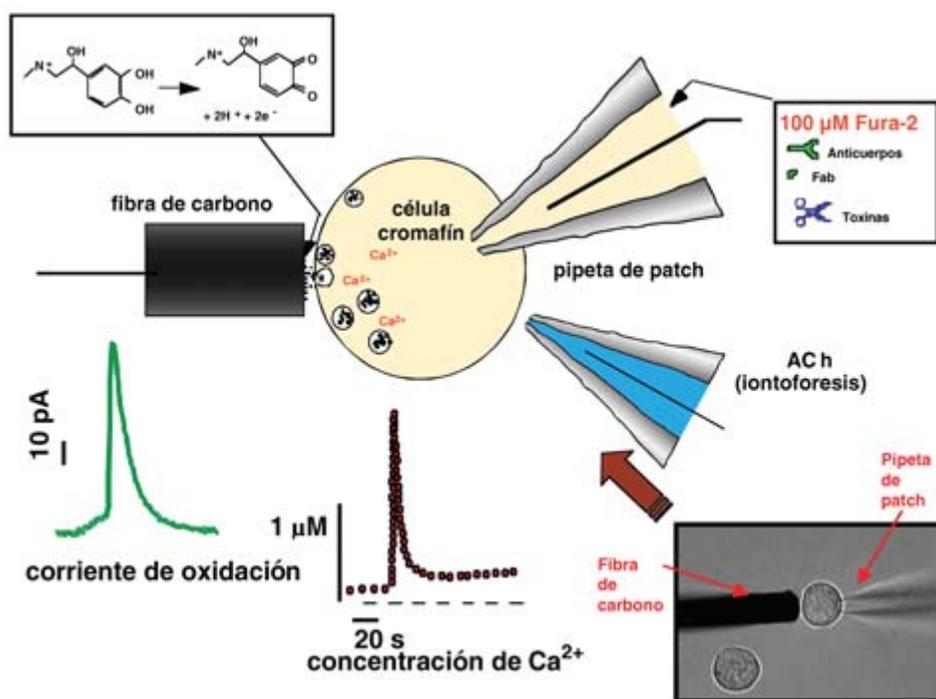


FIGURA 5. Abordaje experimental alternativo para el estudio de la exocitosis en las células cromafines. Se muestra una micrografía y el correspondiente esquema de una célula cromafín en la configuración de célula completa de la técnica de «patch-clamp». La pipeta de «patch-clamp» se emplea para inyectar indicadores fluorescentes y reactivos específicos en el interior de la célula (recuadro superior derecho). En este caso, se recurre a la administración iontoforética de acetilcolina (ACh) para elevar la concentración citosólica de Ca^{2+} , y la respuesta secretora se mide mediante amperometría. Esta técnica detecta la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas en la superficie de un microelectrodo que se sitúa en contacto con la membrana celular (recuadro superior izquierdo).

laminas en la superficie de un microelectrodo de fibra de carbono que se coloca en contacto con la superficie celular, pudiendo llegar a detectarse las catecolaminas liberadas por gránulos cromafines individuales (49, 50).

Este abordaje experimental, que permite el registro durante períodos prolongados de tiempo (~1 hora) de la actividad secretora de una célula cromafín, fue el empleado para evaluar los efectos del anticuerpo Cl69.1, que reconoce los últimos 17 aminoácidos del extremo amino-terminal de la sinaptobrevina (51). Esta región no forma parte del dominio SNARE de la proteína, por lo que dicho anticuerpo no interfiere con la formación *in vitro* del complejo ternario ni modifica su susceptibilidad a la destrucción por NSF —de hecho el anticuerpo se une tanto a la forma libre de la sinaptobrevina como a la incluida en el complejo ternario—. De forma congruente con estos datos, la introducción de los fragmentos Fab del anticuerpo Cl69.1 no modifica la respuesta secretora inducida por la administración iontoforética de acetilcolina y medida mediante amperometría. No obstante, cuando se introduce el anticuerpo completo se observa una lenta pero total inhibición de la respuesta secretora, posiblemente como consecuencia de impedimentos estéricos generados por la macromolécula (52).

El segundo anticuerpo al que me referiré es el Cl71.1, que reacciona con una región correspondiente a los aminoácidos 20 a 40 del extremo amino-terminal de SNAP-25 que forman parte del dominio SNARE de la proteína, por lo que impide la formación *in vitro* del complejo ternario, aunque no su desensamblaje (53). Una vez introducido en el interior de una célula cromafín, el anticuerpo Cl71.1 reduce sustancialmente tanto el componente fásico como el tónico de la respuesta secretora. Mientras que el efecto sobre el componente tónico es probablemente debido a la capacidad del anticuerpo para impedir la formación del complejo de fusión, la interpretación del efecto sobre el componente fásico precisa de información adicional sobre las características de este componente. En la mayoría de las células cromafines, un análisis cinético detallado de la respuesta fásica en condiciones control permite resolver, a su vez, dos componentes en la misma: uno rápido que, cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular alcanza los 20-30 μM , discurre con una constante de tiempo de 30 ms, y otro más lento que presenta una constante

de tiempo de 300 ms para esa misma concentración de Ca^{2+} . Estos componentes permitirían la identificación de dos conjuntos o contingentes de vesículas con distinta probabilidad de ser liberadas y que se han denominado como rápida (RRP, «readily releasable pool of vesicles») y lentamente (SRP, «slowly releasable pool of vesicles») liberables. Es particularmente interesante el hecho de que el anticuerpo Cl71.1 elimine en el 90 por 100 de las células el componente rápido sin afectar a la amplitud o la cinética del componente

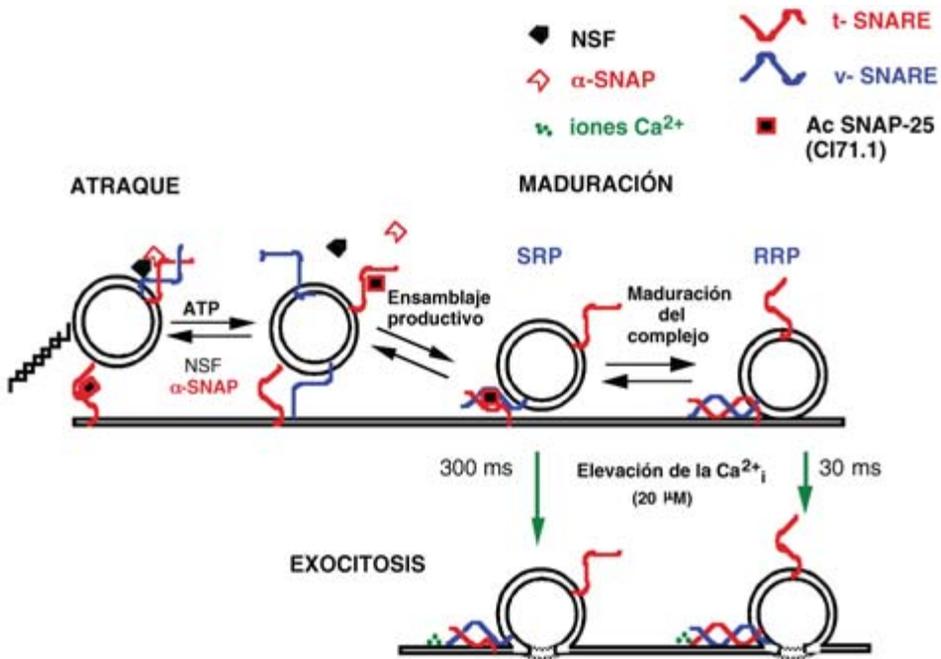


FIGURA 6. En la célula cromafín existen dos poblaciones de vesículas con distinta probabilidad de ser liberadas. Un análisis cinético detallado de la respuesta secretora inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} permite identificar una población vesicular de liberación rápida (τ : 30 ms; RRP, «readily releasable pool of vesicles») y otra de liberación lenta (τ : 300ms; SRP, «slowly releasable pool of vesicles»). El anticuerpo Cl71.1, que reconocen el dominio SNARE de SNAP-25, bloquea la respuesta secretora dependiente de la fusión de las vesículas del contingente RRP sin afectar a la liberación de las del SRP. El esquema muestra que el complejo de fusión puede encontrarse en dos estados, laxo y tenso, en función del grado de ensamblaje (parcial y completo), que estarían en equilibrio entre sí y que serían distinguidos por el anticuerpo Cl71.1. Véase el texto para una explicación más detallada.

lento (52). Estos resultados sugieren que posiblemente el complejo ternario se encuentre en dos estados que denominamos laxo y tenso («loose» y «tight») en función del nivel de ensamblaje (parcial o completo) —lo que determinaría el grado de yuxtaposición de los dominios más próximos a las membranas y, consiguientemente, de las dos membranas—, que se encontrarían en equilibrio entre sí y que serían distinguidos por este anticuerpo en virtud de su capacidad para unirse al complejo parcialmente ensamblado y, además, impedir que el ensamblaje del mismo se complete. Asimismo, ambos estados serían molecularmente responsables de la existencia de dos contingentes de vesículas con cinéticas de liberación diferentes (RRP y SRP) (Figura 6).

La existencia de dos contingentes vesiculares con distinta probabilidad de ser liberados dota a la célula cromafín —al igual que a las neuronas— (54, 55) de la capacidad de adaptar su respuesta secretora al patrón de estimulación. Así, las breves elevaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular (« Ca^{2+} spikes») producidas por la descarga de un tren de potenciales de acción movilizarán preferentemente a las vesículas del contingente RRP, mientras que una elevación sostenida aunque relativamente importante ($10 \mu\text{M}$) de dicha concentración —inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} y probablemente también por potenciales de acción que desencadenen el fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) o en los que la entrada de Ca^{2+} se vea incrementada por la fosforilación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L— ocasionará la fusión de las vesículas del contingente SRP (45). Además, siempre que la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} se prolongue suficientemente —por ejemplo, en respuesta a agentes que liberen Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares dependientes de inositol trifosfato— se estimulará el proceso de maduración vesicular (el componente tónico de la respuesta) que posibilitará la reposición de los contingentes RRP y SRP (56).

Las sinaptotagminas son una familia de proteínas vesiculares que presentan dos dominios C2, C2A y C2B, con capacidad de unirse de forma dependiente de Ca^{2+} a los fosfolípidos de membrana y a algunos de los componentes del complejo de fusión (SNAP-25 y sintaxina). El dominio C2B participa también en procesos de multimerización dependientes de Ca^{2+} y en la unión a fosfoinosítidos, a proteínas

implicadas en la endocitosis y a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (13). La sinaptotagmina I es una isoforma de la sinaptotagmina particularmente abundante en neuronas y que presenta una K_D de 3-6 μM para el Ca^{2+} (57) —curiosamente el receptor de Ca^{2+} implicado en la fusión de las vesículas del contingente RRP de la célula cromafín tendría una K_D de 10 μM , a tenor de los modelos matemáticos desarrollados por el grupo de E. Neher—. Por ello, desde hace algunos años se viene considerando a esta proteína como el receptor de Ca^{2+} de la exocitosis regulada (15, 57, 58). En células cromafines procedentes de ratones «knock-out» para el gen de la sinaptotagmina I se observa una marcada disminución de la respuesta fásica a la fotoliberación de Ca^{2+} sin compromiso aparente de la respuesta tónica. Este efecto se asocia a un incremento de la latencia —período de tiempo entre la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico y el inicio de la exocitosis— de la respuesta fásica

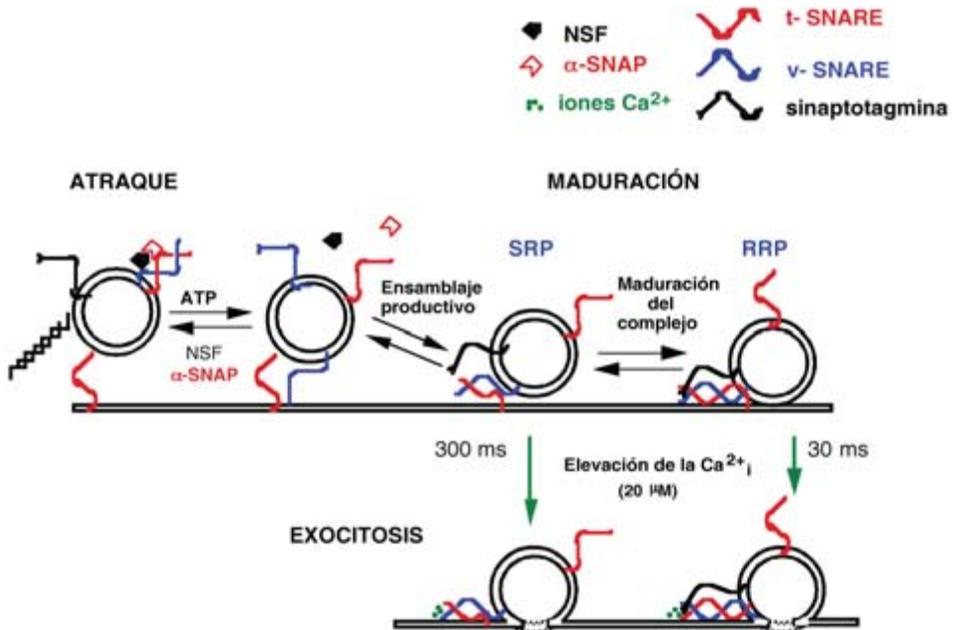


FIGURA 7. La sinaptotagmina I puede ser el receptor de Ca^{2+} específico del contingente de vesículas rápidamente liberables (RRP). En ratones carentes («knock-out») del gen de la sinaptotagmina I se produce la desaparición del contingente de vesículas RRP. Véase el texto para una explicación más detallada.

residual que, además, transcurre más lentamente. Este enlentecimiento se produce a costa de la desaparición del componente rápido de la respuesta fásica (RRP) y se observa en un rango de concentraciones de Ca^{2+} intracelular muy amplio (8-100 μM). Ello supondría la pérdida en estos animales de una respuesta exocitotica rápida y sincrónica con la entrada de Ca^{2+} (59). En el contexto del esquema secuencial de la exocitosis, los resultados que acabo de describir podrían interpretarse en el sentido de que la sinaptotagmina I regularía el equilibrio entre los estados parcial y totalmente ensamblado—cuya estabilidad estaría muy disminuida en ausencia de dicha proteína— del complejo de fusión o, alternativamente, serviría como receptor de Ca^{2+} del contingente de vesículas de liberación rápida (RRP) (Figura 7).

Un estudio reciente, llevado a cabo también en células cromafines, ha posibilitado la distinción entre ambas posibilidades (60). En dicho estudio se emplearon células procedentes de ratones «knock-in» portadores de una mutación (R2333Q) en el dominio C2A de la sinaptotagmina I, que disminuye su afinidad para unirse de forma dependiente de Ca^{2+} a los fosfolípidos de membrana sin modificar su capacidad para unirse a la syntaxina (61). En estos animales se mantuvo el tamaño relativo de los contingentes RRP y SRP, aunque se observó un desplazamiento hacia la derecha de la curva que relaciona la velocidad de liberación del contingente RRP con la concentración citosólica de Ca^{2+} y un incremento de la concentración de Ca^{2+} necesaria para activar dicha liberación. Estos resultados son compatibles con un aumento de la K_D del receptor de Ca^{2+} que controla la fusión de las vesículas del contingente RRP, y sugieren que la reacción que dispara la exocitosis rápida es la unión de la sinaptotagmina I a los fosfolípidos de la membrana celular.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KATZ, A. (1969). The release of neural transmitter substances. The Sherrington Lectures X. Liverpool University Press.
- (2) ELMQVIST, D. y QUASTEL, D. M. (1965). A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol.* 178: 505-529.
- (3) HEUSER, J. E.; REESE, T. S.; DENNIS, M. J.; JAN, Y. y JAN, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81: 725-730.

- (4) SÜDHOF, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.
- (5) SÜDHOF, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27: 509-547.
- (6) PALFREY, H. C. y ARTALEJO, C. R. (1998). Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83: 969-989, 1998.
- (7) KLINGAUF, J.; KAVALALI, E. T. y TSIEN, R. W. (1998). Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*. 394: 581-585.
- (8) JAHN, R.; LANG, T. y SÜDHOF, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112: 519-533.
- (9) FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. y SÜDHOF, T. C. (1999). Genetics of synaptic vesicle function: Toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 753-776.
- (10) JANZ, R. y SÜDHOF, T. C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94: 1279-1290.
- (11) HILFIKER, S.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A. J.; KAO, H. T.; AUGUSTINE, G. J. y GREENGARD, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354: 269-279.
- (12) SÜDHOF, T. C.; BAUMERT, M.; PERIN, M. S. y JAHN, R. (1989). A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. *Neuron* 2: 1475-1481.
- (13) BROSE, N.; PETRENKO, A. G.; SUDHOF, T. C. y JAHN, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256: 1021-1025.
- (14) SUDHOF, T. C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277: 7629-7632.
- (15) YOSHIHARA, M.; ADOLFSEN, B. y LITTLETON, J. T. (2003). Is synaptotagmin the calcium sensor? *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 315-323.
- (16) SÖLLNER, T.; WHITEHEART, S. W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P. y ROTHMAN, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324.
- (17) SÖLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W.; SHELLER, R. H. y ROTHMAN, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-418.
- (18) WHITEHEART, S. W.; ROSSNAGEL, K.; BUHROW, S. A.; BRUNNER, M.; JAENICKE, R. y ROTHMAN, J. E. (1994). N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* 126: 945-954.
- (19) ROTHMAN, J. E. (2002). The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nat. Med.* 8: 1059-1062.
- (20) HANSON, P. I.; ROTH, R.; MORISAKI, H.; JAHN, R. y HEUSER, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90: 523-535.

- (21) SUTTON, R. B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R. y BRUNGER, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395: 347-353.
- (22) PLATTNER, H.; ARTALEJO, A. R. y NEHER, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex: Analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J. Cell Biol.* 139: 1709-1717.
- (23) AUNIS, D. y LANGLEY, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand.* 167: 89-97.
- (24) HODEL, A.; SCHÄFER, T.; GEROSA, D. y BURGER, M. (1994). In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 269: 8623-8626.
- (25) ROTH, D. y BURGOYNE, R. D. (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 351: 207-210.
- (26) MORGAN, A. y BURGOYNE, R. D. (1995). A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 14: 232-239.
- (27) GERBER, S. H. y SÜDHOF, T. C. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51: Suppl 1: S3-11.
- (28) BURGOYNE, R. D. y MORGAN, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83: 581-632.
- (29) ARTALEJO, A. R. (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: «The electrophysiology of neuroendocrine cells». Schreübl, H. & Hescheler J. (eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. págs. 259-299.
- (30) HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B. y SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
- (31) TSIEN, R. Y. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods Cell Biol.* 30: 127-156.
- (32) NEHER, E. y MARTY, A. (1982). Discrete changes in cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6712-6716.
- (33) KAPLAN, J. H. y ELLIS-DAVIES, G. C. (1988). Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6571-6575.
- (34) NEHER, E. y ZUCKER, R. (1993). Multiple Ca-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10: 21-30.
- (35) RETTIG, J. y NEHER, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298: 781-785.
- (36) KIBBLE, A. V.; BARNARD, R. J. y BURGOYNE, R. D. (1996). Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 109: 2417-2422.
- (37) ASHERY, U.; BURGOYNE, R. D. y NEHER, E. (1999). Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells. *EMBO J.* 18: 3293-3304.
- (38) SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSETTO POLVERINO DE LAURETO, P.; DASGUPTA, B. R. y MONTECUCCO, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neuro-

- toxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359: 832-835.
- (39) BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; NIEMANN, H. y JAHN, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12: 4821-4828.
- (40) BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; LINK, E.; BINZ, T.; YAMASAKI, S.; DE CAMILLI, P.; SÜDHOF, T. C.; NIEMANN, H. y JAHN, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365: 5160-5163.
- (41) NIEMANN, H.; BLASI, J. y JAHN, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4: 179-185.
- (42) HAYASHI, T.; MCMAHON, H.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; HATA, Y.; SUDHOF, T. C. y NIEMANN, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13: 5051-5061.
- (43) HAYASHI, T.; YAMASAKI, S.; NAUENBURG, S.; BINZ, T. y NIEMANN, H. (1995). Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *EMBO J.* 14: 2317-2325.
- (44) XU, T.; BINZ, T.; NIEMANN, H. y NEHER, E. (1998). Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat. Neurosci.* 1: 192-200.
- (45) SØRENSEN, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Arch.* 448: 347-362.
- (46) SØRENSEN, J. B.; NAGY, G.; VAROQUEAUX, F.; NEHRING, R. B.; BROSE, N.; WILSON, M. C. y NEHER, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114: 75-86.
- (47) WEIMER, R. M.; RICHMOND, J. E.; DAVIS, W. S.; HADWIGER, G.; NONET, M. L. y JORGENSEN, E. M. (2003). Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat. Neurosci.* 6: 1023-1030.
- (48) VOETS, T.; TOONEN, R. F.; BRIAN, E. C.; DE WIT, H.; MOSER, T.; RETTIG, J.; SUDHOF, T. C.; NEHER, E. y VERHAGE, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31: 581-591.
- (49) WIGHTMAN, R. M.; JANKOWSKI, J. A.; KENNEDY, R. T.; KAWAGOE, K. T.; SCHROEDER, T. J.; LESZCZYNSZYN, D. J.; NEAR, J. A.; DILIBERTO, E. J. JR. y VIVEROS, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10754-10758.
- (50) CHOW, R. H.; VON RUDEN, L. y NEHER, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356: 60-63.
- (51) EDELMANN, L.; HANSON, P. I.; CHAPMAN, E. R. y JAHN, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14: 224-231.
- (52) XU, T.; RAMMNER, B.; MARGITTAL, M.; ARTALEJO, A. R.; NEHER, E. y JAHN, R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99: 713-722.
- (53) BRUNS, D.; ENGERS, S.; YANG, C.; OSSIG, R.; JEROMIN, A. y JAHN, R. (1997). Inhibition of transmitter release correlates with the proteolytic activity of

- tetanus toxin and botulinus toxin A in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis*. *J. Neurosci.* 17: 1898-1910.
- (54) SCHNEGGENBURGER, R.; SAKABA, T. y NEHER, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci.* 25: 206-212.
- (55) STEVENS, C. F. (2003). Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 40: 381-388.
- (56) VON RUDEN, L. y NEHER, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262: 1061-1065.
- (57) GEPPERT, M.; GODA, Y.; HAMMER, R. E.; LI, C.; ROSAL, T. W.; STEVENS, C. F. y SUDHOF, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-727.
- (58) LITTLETON, J. T.; STERN, M.; SCHULZE, K.; PERIN, M. y BELLEN, H. J. (1993). Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca^{2+} -activated neurotransmitter release. *Cell* 74: 1125-1134.
- (59) VOETS, T.; MOSER, T.; LUND, P. E.; CHOW, R. H.; GEPPERT, M.; SUDHOF, T. C. y NEHER, E. (2001). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11680-11685.
- (60) SØRENSEN, J. B.; FERNÁNDEZ-CHACÓN, R.; SUDHOF, T. C. y NEHER, E. (2003). Examining synaptotagmin I function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 122: 265-276.
- (61) FERNÁNDEZ-CHACÓN, R.; KONIGSTORFER, A.; GERBER, S. H.; GARCÍA, J.; MATOS, M. F.; STEVENS, C. F.; BROSE, N.; RIZO, J.; ROSENMUND, C. y SUDHOF, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410: 41-49.

Calibración, comparación de métodos y estimación de parámetros en el análisis químico y farmacéutico (*)

AGUSTÍN GARCÍA ASUERO

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

En este trabajo se pasa revista a la problemática del ajuste de una línea recta cuando se realizan observaciones replicadas. Este tópico se encuentra estrechamente relacionado con cuestiones básicas, tales como curvas de calibrado relacionando el valor medido de una respuesta con la propiedad de un material, comparación de dos métodos analíticos aplicado a diferentes concentraciones de material, relaciones en las que el tiempo es la variable x , y estimación de parámetros. El tema reviste en adición un gran interés en el ámbito de las medidas físicas y químicas, de tanta aplicación en las Ciencias Farmacéuticas y afines.

Palabras clave: Mínimos cuadrados.—Replicación.—Líneas rectas.

SUMMARY

Fitting straight lines with replicated observations is considered in this paper. This topic is closely related to very basic operations, for example, calibration curves relating measured value of response to a property of materials, comparison of two analytical methods applied to a range of test materials, relationships in which time is the x -variate, and parameter estimation methods. The subject has a great

(*) Discurso de Toma de Posesión como Académico Correspondiente, leído en la Junta Pública de la Real Academia Nacional de Farmacia, celebrada el jueves 17 de junio de 2004.

interest in the field of chemical and physical measurements, which are widely applied in the pharmaceuticals and related sciences.

Key words: Least squares.—Replicated observations.—Straight lines.

EXTENSIVE ABSTRACT

Calibration, method comparison and parameter evaluation in chemical and pharmaceutical analysis

Several aspects of least squares, particularly in regard to the use of replication, error analysis and weighing and data transformations, appears to be poorly understood by a number of experimenters. Examples are given from older and more recent literature where experimental data were processed in an incorrect way from the point of view of statistics. As a matter of fact, however, the statistical methods most commonly misapplied by analytical chemists are correlation and regression. There is no doubt of the importance of these topics, which are closely related to very basic operations, e.g., calibration and the comparison of two analytical methods applied to a range of test material. In analytical chemistry as well as in other quantitative sciences it is often necessary to fit a mathematical equation or model to experimental data. Common situations that may be described by functional relationships include calibration curves relating measured value of response to a property of material, comparison of analytical procedures, relationships in which time is the x-variate and parameter estimation methods. Parameters of the approximating function, however, are frequently derived using the least-squares methodology.

To demonstrate that a least squares criterion is valid it is necessary to assume: i) that the errors, ε_i , are random rather than systematic, with mean zero and variances $\sigma_i^2 = \sigma^2/w_i$ (where σ is a constant and w_i is the weight of point) and follow a gaussian distribution; this distribution is so common that is also referred to as the normal one; ii) that the independent variable, i.e., x , the abscissa, is known exactly or can be set by the experimenter either; iii) the observations, y_i , are in an effective sense uncorrelated and statistically independent, i.e. for $\text{cov}(\varepsilon_i, \varepsilon_j) = 0$ for $i \neq j$, with means equal to their respective expectations or true values, $E\{y_i\} = \eta_i$; and (iv) that the correct weights, w_i , are known. The least squares criterion gives indeed poor results, however, if the observations are incorrectly weighted or if the data contain «outliers», i.e., very poor observations at higher frequency than allowed for by the normal distribution. When the conditions are met, the parameter estimates found by minimization of a least squares criterion are best unbiased linear estimates of the regression parameters.

Real data are often subject to problems that make the use of classical statistics based on the normal distribution, difficult. The main practical problem probably is the occurrence of outliers. Another difficulty can be that the distribution of the data is not normal. The normality assumption is, in fact, quite reasonable to expect the y_i to be independent in many situations if they are the results of separate

isolated non interfering measurements. Thus, assumption normality, nevertheless, is a plausible assumption as an error term is made up of the combination of a large number of small chance effects arising from several sources. Such a combination tends to produce a normal distribution, regardless of the distribution of the separate errors (the Central Limit Theorem) if its variance is finite.

In the context of most calibration problems the assumption relative to the abscissa variable is reasonable because the analyte concentrations (x values) are precise enough. Particular attention must be given to equation in which one variable is involved on both sides. Then an error in this quantity appears in both coordinates mutually correlated in both conditions, i.e., the independent variable x is not an exact quantity and the independence of errors is not fulfilled.

When the abscissa range, e.g. concentration, span several orders of magnitude, the precision of the y values vary greatly over the range of the x values. There two main solutions to the problem of non constant variance: Transform the data, or perform a weighted least squares regression analysis as several authors have pointed out is a better solution.

It is obvious that estimates of error variances independent both of the assumed model and the method of fitting can only be obtained from replicates at each point. It is important to understate that repeated runs must be genuine repeats and not just repetitions of the same reading. The question of how many replicate measurements to take must include consideration of the magnitude of variability, availability of the test material and reagent, the time required, the cost of each measurement, and the variability required in the final result. Even within the concepts that are based on the construction of a calibration curve, there is no consensus about the choice of calibration samples and the number of replicates. As the number of replicate increases, however, the central limit theorem states that the frequency distribution for the mean value approaches normality (very rapidly indeed, especially if the parent distribution is symmetric). This fortunate circumstance provides a very important, but little recognized basis for replication of analyses.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas estadísticas se basan en suposiciones, y la validez de los resultados obtenidos en la práctica depende de que las condiciones supuestas se satisfagan, al menos con un grado suficiente de aproximación. Exner ha suministrado recientemente ejemplos variados en los que los datos experimentales se procesan de manera incorrecta desde el punto de vista estadístico. Vamos a tratar la problemática del ajuste de una línea recta a un conjunto de datos biva-riantes, cuando se llevan a cabo observaciones replicadas, sin perder de vista el ámbito de las medidas físicas y químicas, de tanta aplicación en Química y Farmacia. La «Conferencia Internacional sobre

Harmonización (ICH)», por ejemplo, establece el análisis por regresión para definir la vida media de los fármacos en su guía sobre «Ensayos de Estabilidad de Nuevos Fármacos y Productos».

Los modelos sencillos facilitan en gran número de ocasiones la interpretación de complejos fenómenos físico-químicos. Si existe un competidor al «test t» en popularidad, probablemente éste sea la regresión. En adición, quizá la solicitud más común de ayuda que reciben los estadísticos de sus colegas no estadísticos sea el ajuste de una relación lineal a un conjunto de datos. A pesar de esto, correlación y regresión son los métodos más mal aplicados por los analistas. No hay duda de la importancia de estos temas, relacionados con cuestiones básicas tales como la calibración, la comparación de dos métodos analíticos aplicados a materiales de ensayo, a diferentes concentraciones, o la estimación de parámetros. Por otra parte, la introducción de regulaciones para el control de la producción de alimentos, de productos farmacéuticos y del medio ambiente, ha originado un gran interés en la validación de los métodos analíticos.

POSTULADOS DE LOS MÍNIMOS CUADRADOS

En las Ciencias Farmacéuticas, como en otras ciencias cuantitativas, es a menudo necesario ajustar una ecuación matemática o modelo a un conjunto de datos experimentales. Situaciones que pueden describirse por medio de relaciones funcionales incluyen curvas de calibración que relacionan un valor medido o respuesta con la propiedad de un material, comparación de procedimientos analíticos y relaciones en las que la variable x es el tiempo. A este respecto, Deming enfatiza que algunos investigadores todavía «ajustan los datos a un modelo», lo que sugiere una falta de integridad científica. Lo que hacen, naturalmente, es ajustar un modelo a los datos.

Si son necesarias meras estimaciones de parámetros, puede emplearse cualquier criterio de acuerdo con las preferencias estéticas; la suma mínima de los módulos, el criterio de *minimax*, etc. El problema se presenta cuando es necesario deducir inferencias acerca de la fiabilidad de los parámetros y/o sobre la fiabilidad del modelo. Bajo condiciones ideales, el método de los mínimos cuadrados es el preferido para ajustar ecuaciones teóricas a un conjunto de

datos experimentales. La suma (ponderada) de los cuadrados de los residuales —desviaciones con respecto a la función de ajuste—, se hace tan pequeña como sea posible. Su principal ventaja es que suministra una estimación de la incertidumbre de los parámetros. El ajuste estadístico de una línea recta se conoce generalmente como regresión lineal, en donde la palabra regresión tiene tan sólo un significado histórico.

Para demostrar que un criterio de mínimos cuadrados (ponderados) es válido es necesario asumir: i) que los errores cometidos son aleatorios y no sistemáticos, con medio cero y varianza no uniforme; ii) que siguen una distribución gaussiana; esta distribución es tan común que nos referimos a ella como normal; iii) que la variable independiente, i.e., x , la abscisa, se conoce exactamente o puede ser establecida (fijada) por el experimentador; iv) que las observaciones y_i son estadísticamente independientes, esto es, no se encuentran correlacionadas, coincidiendo las medias con sus respectivas expectativas o verdaderos valores; y v) que los pesos correctos, números positivos, son conocidos; esto requiere conocer, a su vez, la forma funcional de la dependencia de x con la varianza de y . El criterio de los mínimos cuadrados da lugar, no obstante, a resultados cuestionables si las observaciones no se ponderan correctamente o si los datos contienen resultados atípicos, esto es, observaciones (pobres) a frecuencias mayores que las permitidas por la distribución normal.

Se asume el caso general de precisión no uniforme o heterocedasticidad; la cantidad medida es determinable no con varianza constante (homocedástica) sino dependiente de su magnitud. De hecho, en muchos fenómenos, conforme el nivel de la señal aumenta, se incrementa también el del ruido. De esta manera, se obtiene una aproximación más consistente, que permite, en adición, el uso de un modelo de varianza para definir los posibles pesos. Aunque la regresión lineal ponderada es bien conocida, las aplicaciones en análisis químico y farmacéutico no son muy amplias, presumiblemente porque este tipo de estadística y la forma en cómo se trata en el software estadístico, no son especialmente atractivas.

Muchos investigadores no son conscientes de que los datos que publican violan, claramente, al menos, alguna de las suposiciones inherentes al modelo de regresión. De hecho, las desviaciones de

dichas suposiciones son la regla en el análisis químico y físico. No sólo se dispone en contadas ocasiones de la información exacta concerniente a la relación funcional, sino que, en general, se presentan errores sistemáticos y existe evidencia de que las observaciones siguen distribuciones que tienen colas más alargadas que la normal. «*Muchos, si no la mayor parte de los análisis, pueden tener un sistema de error leptocúrtico*», indicaba Student en los veinte. De hecho, una característica de la mayor parte de los análisis químicos que actúa en contra de la eficacia de muchos métodos clásicos de contrastes de hipótesis es el pequeño número de muestras procesadas. El poder de los métodos estadísticos para detectar pequeñas discrepancias se encuentra severamente limitado por el número de observaciones.

Normalidad

Un aspecto del análisis de datos en el que la práctica habitual no es a veces soportada por la evidencia experimental es la suposición de que las observaciones están normalmente distribuidas. Esta suposición es crítica, ya que desviaciones de la misma pueden ser la causa de que el método de los mínimos cuadrados conduzca a resultados dudosos, incluso con una correcta ponderación. La suposición de que las respuestas están distribuidas normalmente se hace con frecuencia para calcular intervalos de confianza, ensayos de efectos significativos o comparaciones de datos adicionales. Existen ensayos para comprobar la normalidad, pero requieren, en general, más observaciones que las que se llevan a cabo, en general, en los experimentos usuales. Incluso cuando se dispone de datos abundantes, lo usual es no aplicar ensayo alguno.

La condición de normalidad se asume pues *a priori*, a menos que existan objeciones teóricas o indicaciones empíricas en su contra. Aunque Tukey y MacLaughlin sugieren que la distribución normal es tan rara que debería denominarse patológica, su asunción no ocasiona serios errores. La suposición de normalidad, por otra parte, es plausible, ya que un término de error se obtiene como una combinación de un gran número de pequeñas causas (errores aleatorios independientes). Tal combinación tiende a producir una distribución normal con independencia de la distribución de los errores separados

(Teorema Central del Límite) si su varianza es finita. Puesto que la mayor parte de los experimentos implican muchas operaciones para establecer los resultados de las medidas, es razonable suponer que las perturbaciones o errores estarán normalmente distribuidos. De ahí que la normalidad sea una suposición muy frecuente en el análisis por regresión. Los parámetros del modelo se estiman, en la mayor parte de los casos, por mínimos cuadrados, puesto que son eficientes si los errores están normalmente distribuidos.

Muchos resultados normales se satisfacen para poblaciones no normales, y respuestas no normales pueden ser transformadas en normales. Una transformación que estabiliza la varianza es capaz, a menudo, de transformar una variable no normal, sesgada, en una variable razonablemente simétrica y aproximadamente normal. La transformación de escala logra a menudo pues, un doble efecto beneficioso. Hay que tener en cuenta que si la variable original se distribuye normalmente, la variable transformada puede no hacerlo. Con frecuencia, sin embargo, la falta de constancia de la varianza (heterocedasticidad) se asocia simultáneamente con la ausencia de normalidad y la transformación que da lugar a una varianza constante (homocedasticidad) también origina simultáneamente una distribución próxima a la normal.

Robusteza

Una o más observaciones, que no sigan la misma pauta que el resto de los datos, pueden ejercer una gran influencia sobre el modelo de regresión. Los datos reales están sujetos a problemas que dificultan el uso de la estadística clásica basada en la distribución normal. El principal problema práctico es la existencia de datos atípicos. Otra dificultad radica en que, a veces, la distribución de los datos no es normal. Esto puede tratar de corregirse con ensayos para eliminar datos anómalos o con procedimientos que conviertan la distribución en normal. La detección y el rechazo de datos anómalos, en particular, no es a menudo evidente, como indican Walczak y Massart, y una posible alternativa entonces es usar procedimientos estadísticos que sean robustos frente a los datos atípicos o frente a las desviaciones de la normalidad.

Se ha despertado un interés considerable en la estadística «no paramétrica», describiéndose una variedad de métodos robustos de regresión, válidos frente a violaciones de las suposiciones clásicas. Tales herramientas requieren sólo simples suposiciones, tales como aleatoriedad, independencia y simetría. El cálculo de la regresión robusta conlleva mucho tiempo y está ideado para uso con varios errores de distribución que pueden presentarse en la práctica, así como con datos normales contaminados con observaciones indeseables. Los métodos robustos son menos exactos que la estimación por mínimos cuadrados cuando las suposiciones de éstos son ciertas, pero más exactos —a veces mucho más— cuando ellas son falsas, esto es, son insensibles a las violaciones de estas suposiciones. Métodos intensivos de computación de inferencias como «bootstrap» o «jackknife» son, por otra parte, herramientas poderosas con sólo unas cuantas suposiciones referentes a la distribución.

Independencia

La suposición de independencia implica que las perturbaciones en diferentes experimentos son independientes unas de otras, esto es, la perturbación de series separadas no se encuentran sistemáticamente relacionadas, una suposición que se satisface de manera apropiada mediante aleatoriedad. Debe también confirmarse que los errores son independientes o, en otras palabras, no correlacionados con alguna variable. En muchas situaciones es bastante razonable esperar que las y_i sean independientes si son resultado de medidas aisladas, separadas, no interferentes. Sin embargo, en el trabajo de calibración puede aparecer correlación entre los términos de error si la muestra se lleva a cabo de forma inapropiada o las condiciones analíticas varían en función del tiempo (temperatura, degradación, evaporación, dispositivo de deriva, etc.), tal como reconoce Baumann.

La causa más común de dependencia en las respuestas es que sean tomadas de forma secuencial en el tiempo o de una manera sistemática, lo que introduce generalmente una correlación positiva entre las observaciones. La correlación serial o autocorrelación en los datos representa, de esta manera, una violación en lo que respecta a la independencia de los errores de medida.

La correlación pasa a menudo desapercibida. El análisis de series temporales incorpora la estructura de correlación en el modelo usado para analizar los datos. Se aplican los criterios de Durbin y Watson o de Durbin, en orden a comprobar el postulado de independencia como muestran Draper y Smith. Si los y_i son obtenidos a través de alguna combinación funcional de un número de valores medidos, en general, no serán independientes y debe emplearse un formalismo completo. Las perturbaciones no independientes pueden tratarse por mínimos cuadrados generalizados, pero, como en el caso en el que la varianza no es constante, las modificaciones al modelo pueden hacerse bien a partir de la información adquirida por los datos o mediante suposiciones adicionales tales como la naturaleza de la interdependencia.

Abscisa libre de error

Se asume que todos los errores se presentan en los valores medidos de la ordenada y , y_i , y que los errores en los valores de x son despreciables en relación con los de y . Esta no es una restricción en la práctica. Si los errores en x son los mayores, x e y pueden intercambiarse. Es la estructura del experimento antes que la conveniencia o confort del programador lo que determina cuál es la variable independiente y cuál la dependiente.

La regresión lineal por mínimos cuadrados se aplica a menudo para determinar un modelo matemático de calibración que aproxima la relación entre la concentración y la respuesta. La preparación de estándares siempre conlleva un error. Sin embargo, los errores en la x no tienen consecuencias si son menores a una décima parte de los errores en la y . Si el error en la x es mayor, entonces el error total se incrementa significativamente. Además, los parámetros de regresión y los intervalos de confianza calculados a partir de una curva de calibrado son, en dicho caso sesgados, si se usan mínimos cuadrados (ordinarios) ponderados.

En el contexto de la mayor parte de los problemas de calibración, la suposición relativa a la variable abscisa es razonable porque las concentraciones analíticas (valores de x) son suficientemente precisos. La suposición de que los errores se presentan solamente en la

«dirección y», por otra parte, es válida en muchos experimentos; los errores en las señales instrumentales son a menudo de, al menos, un 2-3 por 100 RSD (desviación estándar relativa), mientras que los errores en la preparación de los estándares no deben superar la décima parte de esto.

Los errores en la preparación de los estándares deben reducirse por debajo del 0,05 por 100, con objeto de aprovechar los beneficios que se derivan del uso de un equipo instrumental preciso. Esto resulta siempre posible usando balanzas y equipos volumétricos precisos. La precisión de operaciones volumétricas, tales como la dilución, se mejora a menudo usando balanzas en lugar de pipetas y pesando frascos para el cálculo de volúmenes o utilizando estándares internos. Las modernas técnicas automáticas han mejorado considerablemente la precisión de muchos métodos instrumentales; cromatografía gas-líquido (GL), cromatografía líquida (LC) y electroforesis capilar (CE) suministran señales repetidas con una precisión del 0,5 al 1 por 100; las técnicas espectroscópicas se comportan igual o mejor y el análisis por inyección en flujo muestra muchos ejemplos de RSD del 0,5 por 100 o menores. En tales casos puede ser necesario, bien abandonar la suposición de que x se encuentra libre de error, o mantener la validez de la suposición preparando los estándares gravimétricamente, en lugar de volumétricamente, esto es, lograr una exactitud mayor que la usual.

En el caso de curvas de valoración lineales, el valor de abscisa es el volumen de valorante añadido, que puede considerarse exento de errores aleatorios. Las medidas de los volúmenes pueden efectuarse con una gran precisión, usando una jeringa adecuada o una micropipeta con un dispositivo automático.

En estudios cinéticos, « y » es alguna función que representa la concentración de los materiales de partida o de los productos de reacción, mientras que « x » representa una escala de tiempo. Una práctica común en la determinación de un mecanismo cinético es evaluar las constantes de velocidad a un elevado número de concentraciones. En general, se supone, que en todos los casos las concentraciones se conocen con exactitud, y por tanto que sólo las velocidades contienen términos de error. Las mismas consideraciones se aplican en cinética enzimática; la precisión con la que se conocen las concentraciones de sustrato depende de la exactitud del pipeteo en la preparación de

mezclas de reacción, y si se llevan a cabo diferentes diluciones a partir de una disolución patrón y se adoptan las precauciones oportunas, los errores aleatorios resultantes en las concentraciones de sustrato serán pequeños. Por tanto, es casi siempre razonable suponer que las concentraciones de sustrato se conocen mucho más exactamente que las velocidades de reacción, y en consecuencia, no es una suposición demasiado arriesgada tratar todos los errores achacándolos a la velocidad, lo que normalmente se hace.

La exactitud y precisión del dispositivo usado cuando se mide la absorbancia de una especie transitoria en función del tiempo, por ejemplo, es muy superior a la medida de la absorbancia, en cuyo caso se justifica considerar sólo los errores aleatorios en esta última. En algunos métodos analíticos, no obstante, tales como fluorescencia de rayos X, se usan a menudo como estándares de calibración materiales de referencia certificados, ya que las muestras reales (i.e., materiales geológicos) son demasiado complejas. Por esta razón las incertidumbres, como contemplan «Rius y col.» se encuentran asociadas a ambos valores de concentración de los materiales de referencia y a las respuestas instrumentales.

Aunque puede haber muchos experimentos donde es razonable suponer que una variable está ampliamente exenta de errores, existen otros en los que tal suposición es manifiestamente absurda, como aquellos casos en los que ambas variables se calculan a partir de la misma observación. Debe prestarse particular atención a la ecuación en la que una variable se encuentra situada en ambos miembros, de especial importancia en los «métodos de estimación de parámetros». En estos casos, un error en esta cantidad aparece en ambas coordenadas mutuamente correlacionadas; la variable independiente x no es una cantidad exacta y la independencia de los errores no se satisface.

En el estudio de comparación de métodos se examina un número de muestras por cada uno de los dos métodos a estudiar, y los dos conjuntos de resultados obtenidos se representa en los ejes x - y . Cada punto de esta gráfica representa, por tanto, una muestra examinada por los dos métodos. En este ejemplo, es obvio que los errores de medida deben producirse en ambas direcciones x e y , como se trata en los trabajos de Mac Taggart y Farwell, Martín, y Rius y col., entre otros autores.

En general, cuando los valores para x e y se obtienen mediante medidas: $y_i = \eta_i + \varepsilon_i$, $x_i = \xi_i + \delta_i$, donde x_i e y_i son los valores medidos de las variables. Cuando ambas variables contienen errores, la distinción entre variables dependiente e independiente es ambigua aunque en general se atiende a controlar una de ellas x , y observar la otra y . Sus verdaderos valores son η_i y ξ_i y sus respectivos errores ε_i y δ_i . Note, que se obtienen resultados sesgados cuando se usa el método de los mínimos cuadrados ponderados en la comparación de dos métodos, en base a la suposición de que los valores de x son conocidos sin error alguno. En este contexto pueden plantearse situaciones erróneas cuando se usan los mínimos cuadrados ponderados en el cálculo de los coeficientes de regresión.

Si por alguna razón la precisión con la que los valores de x son conocidos no es considerablemente mejor que la precisión de las medidas de los valores de y , el análisis estadístico basado en el método (ordinario) de los mínimos cuadrados ponderados no es válido y se requiere una aproximación más general. El problema fundamental que surge si las desviaciones se miden en cualquier dirección distinta a la paralela con uno u otro eje, es que tales desviaciones no poseen dimensiones adecuadamente definidas (excepto en el caso usual en el que x e y posean la misma dimensión y, naturalmente, las mismas escalas). La consecuencia práctica de esto es que el ajuste obtenido en este caso dependerá arbitrariamente de las escalas elegidas para la representación. La solución de este problema, que plantea la regresión ortogonal, se aborda mediante diversas estrategias.

Pesos apropiados

Cuando el rango de la abscisa, por ejemplo concentración, se extiende a varios órdenes de magnitud, como ocurre con la calibración, en aquellos casos en los que se investigan concentraciones de drogas en orina u otros fluidos biológicos, la precisión de los valores de y puede variar grandemente a lo largo del rango de valores de x . Esta condición contraviene el requerimiento de homocedasticidad de la regresión lineal (simple) no ponderada. Con la espectrometría de emisión de plasma acoplada a la espectrometría de masas, se

requiere el uso de mínimos cuadrados ponderados, incluso cuando la calibración se lleva a cabo sobre un rango de concentraciones relativamente estrecho.

Matsuda et col. sostienen que debe efectuarse un análisis de ruido y considerar siempre la regresión ponderada como el modo general y la regresión simple como el especial. Casi siempre se encuentra que la precisión absoluta de la determinación, esto es, la desviación estándar, incrementa con la concentración, mientras que la precisión relativa (la desviación estándar relativa) disminuye con la misma. Un tipo común de heterocedasticidad se presenta en la práctica cuando los errores poseen una magnitud relativa constante. Es posible establecer una relación entre la precisión y la concentración sobre el rango de concentración ensayado, cuando los métodos propuestos se aplican a diferentes concentraciones. Varios autores han sugerido relaciones y la norma ISO 5725 (1986) suministra guías para el establecimiento de la existencia de una relación dada. A los datos más fidedignos (menor variabilidad) hay que darles mayor énfasis o peso. De esta manera, no tiene que recalcularse la respuesta frente a la concentración, puesto que los datos originales permanecen inalterados.

El método de los mínimos cuadrados es una herramienta poderosa para el tratamiento de datos, pero sus ventajas pueden estar contrarrestadas si no se contemplan los pesos apropiados. El problema se agudiza debido al hecho de que el criterio de los mínimos cuadrados es altamente sensible a los datos anómalos y a menudo se produce una situación paradójica en la que la observación reconocida como la peor, es la que contribuye más fuertemente a la estimación de los parámetros. Aunque la replicación puede constituir una severa limitación (desde el punto de vista experimental), también posee la ventaja de suministrar una especie de regresión robusta. El método más común de llevar a cabo la regresión ponderada es simplemente usar para los pesos el recíproco de las varianzas. Esta relación asegura que si se emplea replicación, los valores anómalos de y_i tengan pesos más bajos.

Bondad de ajuste del modelo

Se sabe que si el modelo lineal es correcto, los residuales (diferencias entre los valores experimentales y los calculados), obtenidos por mínimos cuadrados, pueden usarse para estimar la varianza del error, y no son necesarias medidas repetidas. Sin embargo, si el modelo lineal no es aplicable, los residuales estiman la suma de un error de ajuste y el error experimental. Es obvio que las estimaciones de la varianza del error independiente de ambos modelos, asumido y método de ajuste, pueden sólo obtenerse mediante replicaciones en cada punto (Feinberg). Por tanto, una comparación de la suma de los cuadrados de los residuales con la suma de los cuadrados de los errores obtenidos de los replicados, suministra un test de la bondad de ajuste del modelo.

MÚLTIPLES MEDIDAS A UNO O MÁS PUNTOS

Con frecuencia es útil realizar experiencias en las que se preparan una o más muestras a los mismos valores de la variable de entrada x . El término conjunto se define como referente a un número de medidas repetidas, independientes, de la misma propiedad. Las medidas repetidas de tal manera que estén sujetas a todas las fuentes de errores aleatorios del experimento se llaman replicados. En aquellos casos en los que estas muestras repetidas se preparan de tal manera que están sujetas a todas las fuentes plausibles de error, se denominan replicados genuinos. La replicación se define así como la realización independiente de dos o más experimentos al mismo nivel, encontrándose todos los factores bajo control.

Para evitar ambigüedad la IUPAC (1994), sin embargo, indica que el término «replicado» o «replicación» debe utilizarse sólo en el contexto de la medida (análisis) y no en el sentido de «separación de múltiples unidades» o recolecta de replicados, a menos que su uso sea explícito. Cuando no todos los factores están presentes, tenemos pseudoreplicados, no válidos para estimar la varianza de la distribución a partir de las observaciones realizadas.

Supongamos que existen k especímenes (muestras) de una variable simple (población normal) a ser analizados. Para cada espécimen

se lleva a cabo un número diferente de replicados: $y_{j,nk}$, nk observaciones repetidas a y_j . Una o más medidas reales replicadas se considera una muestra aleatoria de esta población hipotética infinita. El tamaño (estadístico) de la muestra es el número de medidas que la constituyen. Así, un conjunto de tres medidas replicadas es de tamaño 3 (no tres muestras). Debe prestarse atención al desafortunado pero inevitable uso dual de la palabra «muestra» con dos significados distintos: la muestra química y la muestra estadística.

Los resultados replicados para cada muestra se distribuyen de forma dispersa alrededor de su valor medio, y_j , debido a los errores aleatorios de medida (AMC, 1994); siguiendo estas fluctuaciones la distribución normal. Estas fluctuaciones son impredecibles, debido a los factores experimentales que no se encuentran bajo control rígido y a las limitaciones mecánicas inherentes a los aparatos de medida experimental y a veces también, a la variabilidad inherente al fenómeno estudiado. Llamamos homogéneo a cualquier conjunto de medidas iguales, una vez descartado el error experimental. Para tales conjuntos existen reglas para el rechazo de datos anómalos basados en la teoría de la distribución normal.

La respuesta de interés depende en adición, de la propiedad medida y también de otros factores, tales como la temperatura que rodea la muestra y la humedad relativa, el nivel del instrumento, las impurezas de los reactivos químicos, la exactitud de la balanza o la destreza del operador. Se trata siempre de mantener el control sobre los factores ambientales, y los factores que puedan afectar al proceso de medida, aunque lograr dicho control de forma total es humanamente imposible.

Puede ocurrir incluso en experimentos bien diseñados, que algunos resultados se pierdan debido a un error grosero, rotura del equipo o alguna otra razón. La pérdida de los resultados no puede siempre recuperarse por medio de ensayos repetidos, aunque sea posible esto en experiencias sencillas. No puede excluirse tampoco el caso en que resulte un número desigual de replicados como consecuencia del diseño del experimento.

Replicados genuinos

Es importante comprender que las replicaciones, como insisten Draper y Smith, deben ser muestras repetidas genuinas y no simples repeticiones de la misma lectura. En experiencias químicas, una sucesión de lecturas hechas durante el estado de equilibrio no suministra puntos genuinos repetidos. Cuando los replicados genuinos se realizan bajo un conjunto dado de condiciones experimentales, la variación entre las observaciones asociadas puede emplearse para estimar la desviación estándar de los efectos.

Por replicados genuinos se entiende la variación entre muestras preparadas en las mismas condiciones experimentales, un reflejo de la variabilidad total que afecta a series preparadas a diferentes condiciones experimentales. Este punto requiere cuidadosa consideración. En particular, varios análisis químicos a partir de una muestra sencilla suministran sólo una estimación de la varianza analítica, generalmente solo una pequeña parte de la varianza «run-to-run». Este problema de determinar, de manera errónea, la varianza experimental, ha sido, en general, particularmente inoportuno.

Un beneficio obvio de la replicación es que mejora la fiabilidad de los resultados. Otro beneficio es la facilidad de ensayo de la bondad de ajuste del modelo. La incertidumbre puramente experimental puede obtenerse sólo controlando todos los factores a niveles fijados de antemano y replicando el experimento.

En la preparación y análisis de una muestra de control que comprende las operaciones preliminares de secado, pesada, dilución y posterior doble inyección de una muestra simple preparada siguiendo esta pauta en una columna de HPLC, los únicos factores que pueden producir diferencias entre los resultados medidos son los que operan a partir de la etapa de inyección hacia adelante, esto es, inyección, separación y detección (Mullins, 1994). De acuerdo con esto, dos replicados genuinos en este caso suponen no sólo diferencias debidas a estos últimos factores, sino también diferencias debidas a los errores de secado, pesada y dilución. Por tanto, los replicados parciales podrían sobreestimar seriamente el tamaño del error aleatorio adscrito a las mediciones.

Las repeticiones que comienzan en una etapa tardía (alícuotas de la misma porción de muestras de ensayo disueltas) no suministran (IUPAC, 1994) una estimación de la repetibilidad, puesto que la variabilidad introducida por la omisión de las restantes etapas no se incluye en la medida final. Las medidas repetidas realizadas sobre una disolución muestra, con un instrumento, suministran sólo una estimación de la precisión instrumental.

Número de replicados (normalidad)

Los replicados permiten estimar las magnitudes de las variaciones aleatorias, y es de esperar que las medias de los replicados, si están ausentes errores sistemáticos, se encuentren más próximas al valor verdadero que las lecturas individuales. La cuestión de cuántas medidas replicadas debemos hacer incluye consideraciones acerca de la magnitud de la variabilidad, disponibilidad de reactivos y material de ensayo, tiempo requerido, coste de cada medida y variabilidad requerida en el resultado final.

Esta es una cuestión para la que no hay una contestación clara y simple. Incluso dentro del contexto de la curva de calibrado (IUPAC, ISO y AOAC, 1989; IUPAC, 1990), no existe un consenso acerca de la elección de las muestras de calibración y del número de replicados. Cinco replicados en cada grupo han sido propuestos por Jacquez y col. (1968). Demasiados replicados suponen un esfuerzo adicional (Castillo y Castell, 2001), mientras que con pocos no se consigue la sensibilidad requerida. Tres o cuatro replicados no son suficientes para estimar adecuadamente una varianza; al menos se requieren generalmente de 8 a 10. El Comité de Mejora Ambiental de la ACS (1980) recomienda tres replicados (replicados experimentales) a cinco valores de concentración igualmente espaciadas. No obstante, la reducción en trabajo experimental (diseño de calibración y menores replicados experimentales e instrumentales), no implica necesariamente, según González Casado y col. (1998) una pérdida de información analítica.

Conforme el número de replicados aumenta, la estimación de la varianza total mejora, como es obvio. Sin embargo, superficialmente, uno podría estar tentado en contestar: cuanto más mejor,

basándonos en el teorema del error estándar de la media. Tal razonamiento, sin embargo, es una falacia, como muestra Mandel, dado que el error de replicación es sólo una porción, algunas veces pequeña, del error total. A este respecto deben considerarse además la significación estadística y la práctica, como nos recuerda Davies. Los errores sistemáticos no se reducen con el proceso de promedio.

Conforme el número de replicados aumenta, el teorema central del límite establece, que la distribución de frecuencia para el valor medio se aproxima a la normalidad (muy rápidamente si se parte de una distribución simétrica). Esta afortunada circunstancia suministra una muy importante pero poco reconocida base para la replicación de los análisis. En efecto, la replicación nos permite suponer normalidad (para los valores de la media, no para los valores individuales), una suposición que es bastante difícil de sostener de otra manera; la media de cuatro observaciones es ya muy próxima a la normal. La buena práctica analítica toma este efecto en cuenta cuando se establece el mínimo número deseable de observaciones. En particular, las distribuciones uniforme y binomial suministran un ejemplo ilustrativo de aproximación a la normalidad, siendo posible generar números aleatorios con distribución normal a partir de las mismas (Güell y Holcombe, 1990) con ayuda de lenguajes de alto nivel.

REGRESIÓN ORTOGONAL

En el ámbito del análisis clínico, en donde se aplica con asiduidad la comparación de métodos, a la regresión ortogonal con errores similares en ambas variables o con cociente de varianzas constante se la denomina regresión de Deming. La metodología de esta regresión ha sido estudiada con detalle en *Clinical Chemistry* e incluso Linnet (1997) y Philippe Marquis (1999) han elaborado sendos programas, CBstat y Method Validator, respectivamente, este último de acceso libre en la red. Este tipo de problemas admite solución exacta.

La solución satisfactoria en el caso general cuando hay errores estadísticos en ambas coordenadas ha sido objeto de una intensa investigación. En este último caso resulta necesaria la aplicación de

procedimientos numéricos iterativos. York propone la solución de una ecuación cúbica como punto de partida, aunque una ecuación lineal es más simple, como demuestra Williamson, en quien se basa recientemente Martin (Clinical Chemistry, 2000) para proponer el Programa de «Regresión general ponderada iterativa de Deming». Lisy y col. proponen asimismo un método elegante de resolución del problema basado en el uso de ecuaciones normales. Rius y col. han desarrollado ampliamente las aplicaciones analíticas.

CONCLUSIÓN

El tema de la regresión reviste una importancia vital, ya que se encuentra estrechamente relacionado con el de la calibración, comparación de dos métodos analíticos, validación de métodos analíticos y estimación de errores. Bajo condiciones ideales, el método de los mínimos cuadrados es el preferido, lo que implica una serie de suposiciones (por ejemplo, normalidad, independencia, abscisa libre de error, y ponderación apropiada). Sin embargo, algunos datos publicados violan de forma grosera al menos una de las suposiciones inherentes al modelo de regresión. Si las desviaciones experimentales pueden adscribirse a la variable dependiente y , la cuestión se simplifica considerablemente. Cuando las medidas se obtienen sobre un rango amplio de valores de x , la suposición de uniformidad en la varianza no resulta válida. Ocurre a veces que algunas de las observaciones utilizadas en el análisis por regresión son más dignas de confianza que otras, por lo que la aplicación directa de los mínimos cuadrados convencionales puede conducir a un serio error. Aunque la suposición de homocedasticidad es válida para algunos procedimientos analíticos, otros tales como medidas de cuentas y análisis fotométrico y cromatográfico bajo ciertas condiciones, no la soportan. Existen dos soluciones al problema de la varianza no constante: llevar a cabo una transformación de los datos, o bien un análisis de regresión lineal ponderada, la mejor solución para algunos investigadores. En general, se ha prestado menos atención a la suposición de normalidad subyacente al método de los mínimos cuadrados, que al tema de la varianza no constante. La replicación de las observaciones está asociada con la desviación estándar de los efectos. Los replicados deben ser genuinos a este respecto. Demasia-

da replicación supone un gran esfuerzo, mientras que poca no nos permite alcanzar la información requerida.

AGRADECIMIENTO

La generosidad de los Excmos. Señores Don Manuel Ortega Mata, Don Vicente Vilas Sánchez y Don Segundo Jiménez Gómez (q.e.p.d.), justifica mi presencia en la Real Academia Nacional de Farmacia. A ellos mi más profundo agradecimiento. Trataré como en la parábola de los talentos de corresponder prestando el mejor servicio a esta honorable Institución. Gracias también al Excmo Señor Presidente de esta Real Academia por sus buenos oficios; él sabe que me tiene como uno de sus declarados admiradores, así como al Excmo Señor Don Benito del Castillo, Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, espejo en el cual me he mirado y que me ha honrado a lo largo de los años con su amistad y confianza. Decía John Wayne, cuando se le otorgó el oscar cinematográfico: «de haberlo sabido me hubiera puesto en movimiento mucho antes de entrar en el vientre de mi madre». Muchas gracias también a la Doctora Doña Ana Sayago Gómez y al Doctor Don Antonio Gustavo González González por su colaboración y ayuda en la preparación de este discurso.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) A. G. ASUERO, A. G. GONZÁLEZ (1989). Some observations of fitting a straight line to data. *Microchem. J.* 40: 216-225.
- (2) A. G. ASUERO; A. SAYAGO, M. BOCCIO. Calibration in chemical and pharmaceutical análisis, comunicación privada.
- (3) K. BAUMANN (1997). Regression and calibration for analytical separation techniques. Part II. Validation, weighted and robust regression. *Process Control Qual.* 10: 75-112.
- (4) A. G. GONZÁLEZ, A. G. ASUERO (1993). Computational program for validating analytical results. *Fresenius Z' Anal. Chem.* 346: 885-887.
- (5) A. G. GONZÁLEZ; M. A. HERRADOR, A. G. ASUERO (1999). Intralaboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* 48: 729-726.
- (6) R. F. MARTIN (2000). General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin. Chem.* 46: 100-104.

- (7) J. RIU, F. X. RIUX (1995). Univariate regression models with errors in both axes. *J. Chemometrics* 9: 342-362.
- (8) SAYAGO, A. G. ASUERO (2004). Fitting straight lines with replicated observations by linear regression. II Testing for homogeneity of variances. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 34: 133-146.
- (9) SAYAGO; M. BOCCIO, A. G. ASUERO (2004). Fitting straight lines with replicated observations by linear regression: the least squares postulates. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 34: 39-50.

Análisis retrospectivo de las normas éticas y legales que rigen en la responsabilidad del farmacéutico en Bolivia (*)

HEBBE ISABEL CAMPERO CARRASCO

RESUMEN

Se realizó una recopilación de las normas éticas y legales, decretos y reglamentaciones que rigen el desempeño profesional farmacéutico en Bolivia, desde la pre-colonia hasta nuestros días, permitiendo visualizar los avances logrados en diferentes períodos y su desarrollo a través del tiempo.

Palabras clave: Legislación farmacéutica.—Ética profesional.—Historia.—Bolivia.

ABSTRACT

It was accomplished a summary of the ethical and legal procedures, decrees and regulations that govern the pharmaceutical professional performance in Bolivia, from the pre-colony until our days, permitting to visualize the advances achieved in different periods and its development over time.

Key words: Pharmaceutical legislation.—Professional ethics.—History.—Bolivia.

* Premio Elvira Moragas, 2002.

EXTENSIVE ABSTRACT

Retrospective analysis of the ethical and legal procedures that govern in the responsibility of the pharmacist in Bolivia

La sociedad humana, como resultado de un proceso racional de construcción, es un medio favorable para el aprovechamiento de ventajas necesarias. Al aumentar las necesidades en proporción directa al grado de civilización se ha acentuado la interdependencia de individuos y pueblos entre sí.

Es así que surge la división del trabajo, la especialización y circunscribiéndonos ya a un campo puramente moral, fluye la diferencia entre el trabajo destinado a fines nobles y el destinado a llenar necesidades superfluas o innobles que corrompen la profesión a la que consagra uno la vida.

Lo que estamos comentando nos lleva a investigar la evolución histórica de la legislación farmacéutica en Bolivia, con las normas, decretos y reglamentaciones que rigen el desempeño de nuestra profesión, desde la época pre-colonial hasta nuestros días.

Bolivia, situada en el centro de América del Sur, tiene una extensión de 1.098.581 km² y cuenta con 8.280.184 habitantes.

Se estableció en nuestro territorio entre 1580 a.C. y 1175 d.C. la civilización tiawanacota, cuya principal actividad fue la agricultura. En su proceso de desarrollo cultural y social pasó por tres fases: aldeana, urbana e imperial.

Posteriormente se desarrollan los señoríos aymaras, con el Ayllu como base de la sociedad. En cuanto a sus sistemas de curación, están basados en el origen divino de las enfermedades y tres principios para explicar sus causas: Tesis de la participación, Tesis de los efluvios y Tesis de los cuerpos extraños.

Hacia 1450 los señoríos aymaras fueron conquistados por los incas, cuya máxima autoridad, el Inca, durante la expansión de su imperio encontró, en la región antes llamada Charazani, a los kallawayas —nombre que en quechua quiere decir: «hombre que anda cargando al hombro su saco con hierbas, raíces, pomadas y ungüentos medicinales».

La deontología médica se basaba en la trilogía de la moral quechua que regía desde el emperador hasta el último súbdito:

Ama sua	No seas ladrón
Ama llulla	No seas mentiroso
Ama khella	No seas flojo

El Tribunal Supremo encargado de velar el cumplimiento de las leyes del Inca en materia médica era el Jucha Majchey Machucuna, consejo de ancianos kallawayas, ante quienes se reunían los kallawayas. Algunas de sus normas eran mantener contacto entre ellos, prestarse ayuda, facilitarse medicamentos y proteger el secreto profesional.

La colonización provocó muchos cambios en América, el conocimiento andino, sus paradigmas filosóficos, científicos y culturales convergieron sobre el conocimiento y los valores culturales que trasladaron los conquistadores españoles a estas tierras.

En un principio el médico era al mismo tiempo farmacéutico, posteriormente se declaró la incompatibilidad.

Para la supervisión del ejercicio profesional de médicos, farmacéuticos, flebotomos, parteras y la atención de las boticas se nombra en 1538 un representante del Protomedicato de España con el título de «Sustituto del Protomédico».

Posteriormente se establecen los protomedicatos de Lima y Buenos Aires.

El paso del sistema colonial al sistema republicano marca un cambio fundamental en la historia de nuestro país.

La enseñanza médica y el ejercicio profesional en el curso de los años se consideraron y reglamentaron íntimamente ligadas. Los decretos comprendieron a ambas y las autoridades las fiscalizaron también al mismo tiempo.

El protomedicato, cuyas medidas no estaban vigentes desde 1822, se pone en vigor en la república en 1830. Posteriormente, en 1893 con la creación de los Tribunales Médicos en las capitales de departamento, se cancela el protomedicato.

En lo referente a la regencia de las boticas por médicos, muy frecuente en esa época, se regulariza en 1929 con la aprobación del Reglamento de Farmacias, que dispone la posesión del título de farmacéutico para abrir una botica.

Varias décadas después, en 1996, se sanciona la Ley del Medicamento, que permite a cualquier persona ajena a la profesión, ser propietaria de una oficina de farmacia.

* * *

The human society as a result of a rational process of construction is a favorable system for the use of necessary advantages. When increasing the necessities in direct proportion to the civilization grade it has been accentuated the interdependence of individuals and societies to each other.

It is so the division of the work, the specialization arises and already bounding us to a purely moral field, the difference flows among the work devoted to noble objectives and the one dedicated to fill superfluous or ignoble necessities that corrupt the profession to which one offer the life.

All what we are commenting takes us to investigate the historical evolution of the pharmaceutical legislation in Bolivia, with the norms, ordinances and regulations that govern the acting of this profession, from the pre-colonial time until our days.

Bolivia, located in the centre of South America has an extension of 1.098.581 km² and it has 8.280.184 inhabitants.

It is settled down b.C. in our territory among 1580 and 1175 a.C. the tiawana-cota civilization whose main activity was the agriculture. In their process of cultural and social development it went by three phases: villager, urban and imperial.

Later on the dominions aymaras are developed, with the Ayllu as base of the society. In relation with their cure systems, they are based on the divine origin of the illnesses and three principles to explain their causes: thesis of the participation, thesis of the effluvium and thesis of the strange bodies.

Toward 1450 a.C. the dominions aymaras were conquered by the incan whose maximum authority, the Inca, during the expansion of his empire found, in the

region before called Charazani, to the kallawayas - that in quechua means: «man that is loading to the shoulder their sack with grasses, roots, ointments and medicinal ointments».

The medical deontology was based on the trilogy of the quechua morals that governed from the emperor until the last citizen:

Ama sua	you must not be a thief
Ama llulla	you must not be a liar
Ama khella	you must not be slack

The Supreme Tribunal in charge of guarding the execution of the laws of the Inca in medical aspects was the «Jucha Majchey Machucuna», council of old kallawayas, in front of those met the kallawayas. Some of their norms were to maintain contact among them, to be lent helps, to be facilitated medicines and to protect the professional secret.

The colonization caused many changes in America, the Andean knowledge, its philosophical, scientific and cultural paradigms converged about the knowledge and the cultural values that the Spanish conquerors transferred to these lands.

In a principle the doctor was at the same time a pharmacist, later on the incompatibility was declared.

For the supervision of the professional exercise of doctors, pharmacists, midwives and the attention of the pharmacies is named in 1538 a representative of the Spanish «Protomedicato» with the title of «Sustituto de Protomédico.» Later Lima and Buenos Aires ones settle down.

The step of the colonial system to the republican system marks a fundamental change in the history of Bolivia.

The medical training and the professional exercise along the years were considered and regulated together. The ordinances understood to both and the authorities also investigated at the same time them.

The «Protomedicato» whose directives were not effective from 1822, start again in the republican period in 1830. Later on, in 1893 with the creation of the Medical Tribunals in the department capitals, the protomedicato is cancelled.

Regarding to the property of pharmacies by doctors, was very frequent at that moment, it is regularized in 1929 with the approval of the Regulation of Pharmacies that oblige to the possession of pharmacist's title to open a pharmacy.

Several decades later, in 1996, the law allows to any person can be owner of a pharmacy.

1. INTRODUCCIÓN

La sociología, al ocuparse del fenómeno de la asociación, afirma que no es producto del instinto humano, de un impulso natural del hombre a vivir en común con los demás, sino al contrario, el resultado de un proceso racional de construcción.

Si razones de interés impulsan al ser humano a vivir en sociedad, su vida, por otra parte, no es posible fuera de ella, a más de que no tendría ningún significado. Y si la sociedad es un medio favorable para el aprovechamiento de ventajas necesarias, éstas son el producto de esfuerzos individuales diferentes, pero coordinados en el sentido de satisfacerlos. Son las necesidades las que al aumentar en proporción directa al grado de civilización han acentuado la interdependencia de individuos y pueblos entre sí, al extremo en que se hace patente hoy. Al hombre primitivo, capaz de hacer por sí mismo todas sus herramientas, todos sus útiles, capaz de subvenir a todas sus necesidades, han seguido los hombres cada vez menos capaces de abastecerse, debido al aumento de sus menesteres, al mayor índice de su civilización.

Es así que surge la división del trabajo, la especialización, que responde a necesidades sociales y está determinada por la multiplicidad de las mismas y la insuficiencia del hombre para responder al conjunto de ellas, por lo que es justo pensar en la importancia y la nobleza de cada una de las actividades tendientes a un fin social, de cada uno de los oficios y profesiones.

Circunscribiéndonos ya a un campo puramente moral, fluye la diferencia entre el trabajo destinado a fines nobles y el destinado a llenar necesidades superfluas o innobles.

Corromper una actividad nacida en las necesidades humanas, corromper la profesión a la que consagra uno su vida, es a la vez que un hecho deshonroso para quien lo realice, un hecho antisocial punible.

Lo que estamos comentando nos lleva a plantear el siguiente **problema**: ¿Cómo realizar un análisis retrospectivo de las normas, decretos y reglamentaciones que rigen el desempeño del profesional farmacéutico en Bolivia desde la época pre-colonial hasta nuestros días para que pueda constituirse en un documento de referencia y consulta?

De acuerdo a lo mencionado, el **objeto de estudio** es la ética y legislación profesional, y el **campo de acción** las normas éticas y legales en el desempeño responsable del farmacéutico en Bolivia.

El **objetivo general**, por tanto, fue investigar la evolución histórica de la legislación farmacéutica en Bolivia y plasmarla en un documento que refleje su desarrollo a través del tiempo.

Para alcanzarlo se plantearon varios **objetivos específicos**, entre ellos:

- Revisar la documentación existente referente al tema.
- Ordenar cronológicamente esta documentación.
- Analizar la evolución y los cambios a través del tiempo.

En respuesta al problema planteado se formuló la siguiente **hipótesis**: si las normas, decretos y reglamentaciones que rigen el desempeño profesional farmacéutico en Bolivia desde la pre-colonia hasta nuestros días están recopiladas en un documento base, será posible visualizar los avances logrados en diferentes períodos, asimismo se contará con una fuente de información y consulta especializada, que se pondrá a disposición de los profesionales y estudiantes del área de salud en general y del área farmacéutica en particular.

En el estudio se emplearon los siguientes métodos de investigación científica:

Métodos teóricos

- Histórico lógico, para el estudio de la trayectoria de los fenómenos y acontecimientos de la legislación y deontología farmacéutica en su devenir histórico. Lo lógico permitirá reproducir en el plano teórico lo más importante del fenómeno, lo que constituirá su esencia misma.
- Comparativo, estudia las diferentes fases, etapas, períodos de la evolución de la legislación farmacéutica para establecer criterios o juicios en el transcurrir del tiempo.

Métodos empíricos

- Contacto entre objeto de la investigación y sujeto investigador, entrevistas personales.

- Encuestas.
- Observaciones directas.

Procedimientos lógicos del pensamiento, análisis, síntesis, deducción y abstracción para establecer juicios, principios, relaciones, dependencias y otras características del estudio, con la finalidad de llegar a conclusiones y obtener resultados acordes a la realidad.

El resultado de este proceso permitirá contar con un estudio que refleje la situación y la contribución del profesional farmacéutico en el ámbito de sus importantes funciones en el territorio nacional.

2. DESARROLLO

2.1. Marco contextual

Bolivia se halla situada en el centro de América del Sur. Su extensión territorial es de 1.098.581 km². Limita al norte y este con Brasil, al sur con Argentina, al oeste con Perú, al sudeste con Paraguay y al sudoeste con Chile. Tiene 8.280.184 habitantes, de acuerdo al Censo de septiembre de 2001. Su densidad poblacional es de 7,56 habitantes/km², siendo la más baja de Sudamérica.

La tasa de natalidad (× mil) es de 31,28, y la tasa de mortalidad (× mil) de 58,43. La esperanza de vida al nacer es de 62,92 años.

De acuerdo a datos del Censo Nacional de Población y Vivienda 2001, el 58,6 por 100 de la población boliviana es pobre, es decir, 4.695.464 habitantes, mientras que el 41,4 por 100 se considera no pobre, o sea 3.318.916 habitantes.

Se consideran en el territorio boliviano tres zonas fisiográficas predominantes:

- **Andina**, abarca el 28 por 100 del territorio nacional. Esta zona se halla a más de 3.000 m.s.n.m. y está ubicada entre las cordilleras occidental o volcánica y oriental o real. Entre ambas se encuentra la meseta altiplánica y algunas de las cumbres más elevadas de América, como el Sajama con 6.542 m.s.n.m., el Illampu con 6.421, el Illimani con 6.402,

además del Lago Titicaca, considerado el más alto del mundo por estar situado a 3.810 m.s.n.m. con una extensión de 8.030 km². En esta zona se encuentra también el Salar de Uyuni con una superficie de 10.582 km² y a una altura media de 3.656 m.s.n.m.

- **Sub-andina**, región intermedia entre el altiplano y los llanos orientales, abarca el 13 por 100 del territorio. Comprende los valles y los yungas (valle sub-tropical), con una altura promedio de 2.500 m.s.n.m., se caracteriza por su actividad agrícola y su clima templado a cálido (15-25° C).
- **Llanos**, abarca el 59 por 100 del territorio. Se ubica al norte de la cordillera oriental y comprende las llanuras y extensas selvas, ricas en flora y fauna. Registra una temperatura media anual de 22 a 25° C.

El país está estructurado, política y administrativamente, en nueve departamentos:

Bolivia nace a la vida republicana un 6 de agosto de 1825, como una nación libre, independiente, soberana, multiétnica y pluricultural, tal como reza la Constitución Política del Estado en su artículo 1.º Además adopta para su gobierno la forma de República unitaria, democrática, representativa y presidencialista.

La ciudad de Sucre, desde la fundación de Bolivia, fue designada como Capital Constitucional de la República. Llamada también La Plata, fue fundada en 1538 por Pedro Anzures, Marqués de Campo Redondo.

La Sede de Gobierno es la ciudad de La Paz, fundada en 1548 por Alonso de Mendoza.

La Constitución Política del Estado establece en su artículo 2.º, que la soberanía reside en el pueblo, es inalienable e imprescriptible; su ejercicio está delegado a los poderes Legislativo, Ejecutivo y Judicial. La independencia y coordinación de estos poderes es la base del gobierno.

TABLA 1

<i>Departamento</i>	<i>Superficie (km²)</i>	<i>Zona</i>	<i>Capital</i>	<i>Altitud (m.s.n.m.)</i>
Potosí	118.218	andina	Potosí	4.070
Oruro	53.588	andina	Oruro	3.709
La Paz	133.985	andina	La Paz	3.640
Chuquisaca	51.524	sub-andina	Sucre	2.790
Cochabamba	55.631	sub-andina	Cochabamba	2.558
Tarija	37.623	sub-andina	Tarija	1.866
			Santa Cruz de la	
Santa Cruz	370.621	llanos	Sierra	416
Beni	213.564	llanos	Trinidad	236
Pando	63.827	llanos	Cobija	221

Fuente: Anuario Estadístico I.N.E., 1999.

2.2. Marco teórico

2.2.1. *Época pre-colonial*

Civilización Tiawanacota

Tiawanacu se estableció en la región altiplánica asentándose, en principio, a orillas del lago Titicaca. Varios arqueólogos coinciden en señalar que esta civilización se extiende, aproximadamente, desde 1580 a.C. hasta el 1175 d.C. Según el arqueólogo Carlos Ponce Sanginés, Tiawanacu, en su proceso de desarrollo cultural y social, pasó por tres fases: aldeana, urbana e imperial.

La agricultura fue la principal actividad dentro de la organización económica de Tiawanacu.

Al finalizar su época aldeana con la formación de jerarquías sociales y la división del trabajo, surgieron tres clases sociales: la élite gobernante integrada por sacerdotes, guerreros y miembros del gobierno, la clase media y la clase inferior.

Tiawanacu expandió su poderío sobre las regiones altiplánicas de los valles y la sierra. Sin embargo cuando alcanza su mayor esplendor y expansión se produce su decadencia por causas que hasta ahora no han sido totalmente definidas.

Señoríos Aymaras

Los señoríos aymaras se desarrollaron en la región altiplánica, luego de la desintegración de Tiawanacu, especialmente en torno a un centro conformado por los lagos Titicaca y Poopó y el río Desaguadero.

Los grupos aymaras no conformaron un gran estado, más bien se organizaron en señoríos o reinos independientes.

Dos fueron las principales actividades de los aymaras: la agricultura y el pastoreo.

La base de la sociedad aymara fue el Ayllu, que estaba basado en relaciones de parentesco, es decir, que era un conjunto de personas que reconocían un antepasado común. El grupo de ayllus, que se establecía en un determinado territorio, tomaba el nombre de Marka.

Los ayllus tenían como autoridad al Jilacata. La autoridad política de toda una marka era el Mallku.

Con respecto a la religión, muchas creencias religiosas consideradas aymaras son en realidad comunes a muchas culturas andinas, entre estas creencias tenemos el culto a los fenómenos naturales, a los antepasados o al Dios creador y ordenador del mundo.

Sus principales dioses fueron Wiracocha, el dios creador y ordenador del mundo, y Pachamama o madre tierra.

En cuanto a la organización del espacio y en general de toda la vida de los aymaras, uno de los conceptos más importantes es el de la dualidad. Todo en la naturaleza y en la vida social de los hombres se presenta en pareja. Esta idea parte de la dualidad entre el hombre y la mujer y también en la organización de su propio espacio, pues todas las unidades espaciales aymaras están divididas en dos. Así la filosofía de su cosmovisión es el dualismo vida-muerte.

Se deben hallar y analizar cuáles fueron los métodos usados por los aymaras para promover la salud y prevenir la enfermedad en cada uno de los espacios de tiempo.

Sus sistemas de curación están basados en dos conceptos: Primero, el origen divino de las enfermedades. Segundo, los principios y

la filosofía de la cultura han originado la sistemática de las causas de la enfermedad que se halla basada en tres principios o tesis:

1. Tesis de la participación. Muchas hojas o flores tienen semejanza en su forma, con partes del cuerpo humano, lo que las hace aplicables para la curación del órgano al que se parecen.

2. Tesis de los efluvios. No pudiendo explicar la etiología de muchas enfermedades, el aymara recurre a los mitos atribuyendo su presencia a principios supranaturales.

3. Tesis de los cuerpos extraños. La observación empírica que sobre las enfermedades tuvieron los aymaras determinó la explicación de algunas, expectando que las afecciones elementales quirúrgico-traumáticas por accidentes o guerras eran producidas por cuerpos extraños que venían desde afuera como espinas, flechas; también observó que habían otros cuerpos extraños que ingresan en forma natural como alimentos, parásitos, venenos, etc., por último la actividad de algunos elementos que componen el cuerpo humano que originan diarreas, dolores, cólicos, etc.¹

Un aspecto que tiene incidencia en la salud es aquel que puede llamarse económico, importante para la sociedad aymara, la dualidad político-administrativa que significa oposición y complementariedad. Este factor contribuyó a controlar las enfermedades por la nutrición, el bienestar debido al intercambio de ambientes ecológicos. Los aymaras conocían las diferencias y procesos de reacción fisiológica del hombre al cambiar de niveles de altura de su propio hábitat; con objeto de evitar cualquier problema de salud trasladaban indios de un nivel ecológico parecido para trabajar o colonizar un espacio o región determinada.

Los sistemas medicinales de los aymaras están basados en vegetales, pocos minerales y animales. Los conocimientos sobre las plantas son transmitidos por tres medios: la enseñanza por el maestro, el intercambio de informaciones y la experimentación. La divulgación entre los especialistas es constante y tratan de conocer toda la flora, el médico aymara tiene un principio mencionado por Pachacutec Inca:

¹ LOZA Balsa, GREGORIO, *Enciclopedia de la Medicina Aymara*. Vol. I (OPS/OMS). La Paz. Offset Prisa Publicidad, 1995, pág. 2.

«El médico o herbolario que ignora las virtudes de las hierbas o que sabiendo las de algunas no procura saber las de todas, sabe poco o nada.

Conviénele trabajar hasta conocerlas todas, así las provechosas como las dañosas para merecer el nombre que pretende»².

El Tahuantinsuyo

Hacia 1450 los señoríos aymaras fueron conquistados por los incas que venían desde el norte del lago Titicaca, de la región del Cuzco. Este nuevo pueblo estuvo en nuestro territorio menos de cien años, sin embargo, dejaron una importante herencia cultural.

Una muestra es el idioma quechua hablado actualmente por más de un millón de habitantes de Bolivia; otra, los restos arqueológicos incaicos presentes en el altiplano y en los valles.

El origen del incario, llamado Tahuantinsuyo, se pierde en la leyenda. Los investigadores han calculado que se remonta al siglo XII y que llegó a su pleno desarrollo en el siglo XV.

La dualidad fue también la base de la organización inca. El Cuzco estaba dividido en dos mitades: Hanan y Hurin. Asimismo, los Suyos se hallaban divididos: a la parte de Hanan correspondía el Chincaysuyo y el Collasuyo; mientras que la parte de Hurin estaba formada por el Antisuyo y el Contisuyo.

El Inca fue la máxima autoridad del Tahuantinsuyo, era considerado «hijo del Sol» y recibía, por lo tanto, un culto especial. También el Inca se encontraba en la cúspide de la pirámide social.

Las Panacas o familias reales formadas por los parientes del Inca conformaban la élite de la sociedad cuzqueña.

Los jefes de las etnias conquistadas conformaban una etnia local, que mantenía cierto poder en sus regiones.

La base de la sociedad estaba conformada por los Hatun runas e integrada por artesanos, agricultores, pescadores y pastores. Entre

² GARCILAZO INCA, *Comentarios reales*. Libro 6.º Capítulo XXXVI.

las clases populares encontramos también a los Mitmaq, que eran grupos de población trasladados por el Inca a poblar otras regiones, aunque no perdían contacto con sus grupos de origen. Finalmente se encontraban los yanás, que eran personas extraídas de sus ayllus que se convertían en sirvientes de alguna personalidad o autoridad.

La divinidad más importante fue el Sol o Inti, que recibía un culto oficial en todo el Tahuantinsuyo.

Durante la expansión de su imperio, los conquistadores incas encontraron en la región, antes llamada Charazani (actualmente provincia Bautista Saavedra del departamento de La Paz) hombres diestros en medicina, astrología, magia y ocultismo: los Kallawayas.

Impresionados por las curas que realizaban y con la sabiduría que demostraban en sus prácticas místicas y misteriosas, los llevaron al Cuzco, la capital del Imperio.

Los curanderos Kallawayas —nombre que en quechua quiere decir «hombre que anda cargando al hombro su saco con hierbas, raíces, pomadas y ungüentos medicinales»— eran —lo son todavía porque persisten, si bien en menor escala en su papel de curanderos— empedernidos andariegos, herbolarios itinerantes que en su afán de prodigar su «ciencia» y comercio, recorrían todo el continente americano y pasaban audazmente hasta Europa. Su misma indumentaria era única, del todo extraña a la de los demás vecinos y pueblos visitados; con la infaltable *huaya* (lío, bolsa) multicolor, colgada del hombro y pletórica de amuletos, hierbas desecadas, piedras y menjurjes de toda especie, cuidadosamente clasificados para los distintos fines terapéuticos.

A la vez que «médicos», los Kallawayas eran consejeros, filósofos, defensores del desgraciado, conciliadores en las reyertas de hogar, adivinos y, sobre todo, comerciantes andariegos de extraordinaria resistencia; organizaban su comercio con medicamentos en sus puestos de venta o *Jampicatus*, que pueden considerarse como las primeras boticas. Sus caminatas duraban dos, tres y más años y no tenían horizontes limitados. Al cabo de ese tiempo regresaban al seno de su familia, con la más grande indiferencia sobre las novedades que pudieron ocurrir, así sean trágicas, durante su ausencia. Tenían un poder de asimilación admirable y cada viaje era una experiencia y

un evidente progreso en su indumentaria e ideas; lo era también para su familia y su pueblo³.

En cuanto a la deontología médica se debe comenzar señalando la Trilogía de la moral quechua, que regía desde el emperador hasta el último súbdito:

Ama sua	No seas ladrón
Ama llulla	No seas mentiroso
Ama khella	No seas flojo

cuya preservación era vigilada con extremo rigor.

El Jucha Majchey Machucuna era el Tribunal Supremo encargado de velar el cumplimiento de las leyes del Inca en materia médica. Consejo de ancianos Kallawayas en el que cada ayllu tenía su representante, sus decisiones eran resueltas por mayoría de votos. El Tribunal se reunía en un local donde se encontraba entronizada la Jaiwacuna gallin, piedra sagrada, expresión de la verdad y del derecho.

Anualmente, los Kallawayas se reunían en Charazani ante el Consejo de Ancianos e informaban de sus experiencias en la práctica médica, de curaciones extraordinarias, fracasos, nuevas hierbas con propiedades terapéuticas, de estas conferencias salían a luz nuevos métodos curativos, nuevos conocimientos.

Era obligación de los Kallawayas prestarse toda ayuda y cooperación en el viaje, facilitarse medicamentos, recursos de toda naturaleza, defensa y socorro.

Otra norma era mantener contacto permanente entre ellos, dándose noticias a través de una cadena especial de comunicaciones.

El secreto profesional se refería a mantener en absoluta reserva la naturaleza de los medicamentos utilizados, en relación a los profanos. En ese sentido manejaban los remedios, no en estado natural, sino molidos o reducidos a polvo, recibiendo el nombre de «rik'icho».

³ LOZA BALSAL, GREGORIO, «Enciclopedia...», *op. cit.*, págs. 93, 94, 110, 112, 114.

Nadie que no conozca la ciencia y el arte de curar podía ejercer la profesión bajo sanciones severas, si de esto resultaba un daño, la pena era severísima.

Guardar un secreto, dentro de los Kallawayas, era una virtud, su violación importaba grave delito, sobre todo si afectaba a los intereses de la colectividad o a los individuales en particular.

A pesar de las creencias dominantes sobre las causas de las enfermedades y los sistemas de curación, los pueblos del Alto y Bajo Perú, antes de la Colonia, defendieron su salud por todos los medios a su alcance y con energía y establecieron normas y conceptos realmente admirables.

2.2.2. *Época colonial*

La colonización provocó muchos cambios en América: la economía se basó en la producción minera y en la explotación de los indígenas y de los esclavos traídos de África. En el aspecto social, los españoles dominaron a criollos, mestizos, indígenas y negros; en lo político, el poder central se ubicó en la metrópoli; la religión y la cultura sirvieron también para fortalecer el sistema colonial.

El conocimiento andino, sus paradigmas filosóficos, científicos, culturales convergieron sobre el conocimiento y los valores culturales que trasladaron los conquistadores españoles a estas tierras.

Desde la llegada de los españoles y durante la colonia, la medicina tradicional se mantiene bastante pura porque se practicaba en secreto debido al proceso denominado «extirpación de las idolatrías».

Desde 1609 la persecución a los médicos indígenas fue sistemática, se decide iniciar la campaña denominada «extirpación de las idolatrías». En los textos de esta campaña, en las instrucciones a los confesores, curas doctrineros y párrocos de todas las poblaciones, incluyendo las capitales como Lima o Cuzco, se hallan una serie de medidas que debían tomar para «destruir la idolatría», entre ellas, debían buscar al curandero con objeto de impedir que los indios sean curados por medio de las idolatrías, ya que la medicina y las enfermedades se hallaban bajo la égida de algunos dioses.

Además debían conseguir confesiones sobre las formas de curar, los vegetales y preparados que usaban para mitigar los dolores⁴.

A medida que pasaban los días y los años crecían las exigencias sanitarias; en un principio, el médico era al mismo tiempo farmacéutico o simple proveedor, pagado o gratuito, de las drogas. Sus honorarios comprendían las drogas usadas. Así se le conocía y contrataba para el servicio público. Poco a poco, a medida del incremento del material, fue independizándose y haciéndose presente el farmacéutico, más propiamente el «boticario», ya que la aparición del verdadero farmacéutico corresponde a la época republicana. Más tarde, ya no se permitía a un solo hombre ocuparse de ambas cosas a la vez, de la atención de enfermos y de la de botica. Se declaró la incompatibilidad.

Los boticarios de antaño fueron preparadores de las recetas médicas, «según arte». Batir pomadas, dosificar papelillos y obleas, emulsionar «pociones» y adecuar excipientes, eran las obligaciones cotidianas. Un poco alquimistas y bastante médicos se sentían a menudo para adulterar los «récipe» de los segundos y crear para sí una aureola de curanderos llamados a corregir, con ventaja —la ventaja de tener siempre a mano el medicamento— según ellos, las no siempre atinadas prescripciones médicas.

Las boticas eran centros de reunión permanente para los vecinos eminentes de la villa. A falta de clubes, bares, hoteles u otros lugares de semejante índole, todavía desconocidos en aquellos tiempos, ellas constituían el punto preferido para la cita de desocupados. En ellas se recogía noticias y se organizaban rebeliones contra las autoridades. Y en ellas se podía encontrar también toda la gama de artículos de primera necesidad en abigarrada y pintoresca hermandad. Adminículos de tocador, mistelas y aguas gaseosas, variados dulces, jabones de olor, etc. Pero por encima de todo esto, al noticioso y locuaz informador y diestro comentarista del momento político y de la vida y milagros de los vecinos. Desde entonces quedó en la conversación popular la frase «de todo, como en botica».

Como los establecimientos sanitarios, el ejercicio profesional de médicos, farmacéuticos, flebotomos y parteras, la atención de las bo-

⁴ LOZA BALSA, GREGORIO, «Enciclopedia...», *op. cit.*, pág. 136.

ticas, etc., exigían un contralor permanente, fue necesario crear un organismo superior a cargo de una alta competencia médica, que, desde la sede de cada virreinato, por lo menos, pudiera ocuparse de esa supervigilancia. El primer ensayo fue hecho en 1537. Comenzó por nombrarse un representante del Protomedicato de España, con el título de «Sustituto de protomédico».

Carlos V y la Reina Juana, mediante una Orden expedida en Valladolid, en abril de 1538, impartieron la siguiente instrucción para el Sustituto: «Los Virreyes, Presidentes y Gobernadores hagan visitar las Boticas de sus distritos a los tiempos que les pareciere, y si hubiere medicinas corrompidas las hagan derramar y arrojar, de modo que no puedan usar dellas por el daño que pueden causar»⁵.

Esta vigilancia, concretada en un principio a las boticas, fue ampliada pocos años después, creándose los Protomedicatos y Protomédicos. Fue el Rey Felipe II quien, ampliando la jurisdicción del Protomedicato de España, que había sido creado en 1477, estableció el primer Protomedicato de América, en Lima, por Real Cédula de 11 de enero de 1570.

Como un solo Protomédico resultó insuficiente para atender los dilatados territorios de esta parte de América, tuvo que crearse, por Reales Cédulas de 2 de mayo de 1778 y 24 de noviembre de 1781, el Protomedicato de Buenos Aires. Todavía muy recargadas las labores de ambos Protomédicos —Lima y Buenos Aires— acordaron transferir algunas de sus facultades, como la de conceder licencias para el ejercicio profesional, a los Cabildos y Ayuntamientos, y también a las Reales Audiencias.

El primer Protomédico del Virreynato de Buenos Aires fue el doctor Miguel Gorman, nombrado por el Virrey Vertiz. Sin esperar la ratificación de la Corona, este Virrey expidió el 1 de febrero de 1779 el nombramiento, a la vez que el correspondiente decreto, fijando las atribuciones del nuevo organismo. En lo concerniente a los boticarios menciona:

⁵ *Recopilación de leyes de los Reinos de las Indias, mandadas imprimir y publicar por la magestad católica del Rey Don Carlos II. Nuestro Señor... Corregida y aprobada por la sala de Indias del Tribunal Supremo de Justicia.* Madrid, BOIX, Editor, impresor y librero, calle de Carretas, núm. 8, 1841, págs. 139-141.

«...y asimismo ocurriese a las fatales resultas que ocasiona la subministración De las Medicinas, ya por que a los mas que se titulan Boticarios, les obsta el mismo defecto, y ya por que los Medicamentos simples y compuestos no tienen la precisa virtud...

...a fin de que en cumplimiento de su Ministerio procure el exacto general arreglo De todos los Profesores, Boticas, Aranceles y Hospitales De las Ciudades y Exercito en toda la estensión de este Virreynato, con facultad de examinar y aprobar cualquier individuo en las referidas Artes, visitar Boticas, determinar sus Tarifas y nombrar examinadores y Visitadores De ellas...»⁶.

No eran las licencias absolutas y que no pudiesen ser restringidas y aun canceladas, así a José Hermenegildo Guerrero, Protomédico de la Villa de Potosí y Médico Cirujano y Farmacéutico, por título expedido por el Protomedicato de Lima en 1777, no le permitió la Real Audiencia ejercer sino los cargos de Cirujano y Boticario. A Francisco Xavier Garay que ejercía la Medicina con licencia del Protomedicato de Buenos Aires, el Ayuntamiento de La Plata representó por medio de su síndico y procurador general ante la Real Audiencia:

«Que dicho Garay era completamente inepto para el ejercicio de la medicina, por cuanto que ignoraba aún los primeros rudimentos de la ciencia».

Que se preocupaban las autoridades de la colonia en resguardar la salud, exigiendo idoneidad en los que ejercían la medicina, lo prueban diversas disposiciones que se tomaron.

El Presidente Joaquín del Pino en 1779 quitó a la Municipalidad la facultad de conceder licencias, para mejor vigilar el ejercicio de la medicina, porque los colonos eran víctimas de los impostores y medicastros que en esa época pululaban en las poblaciones alto-peruanas. El 17 de noviembre de 1797 el Protomedicato de Buenos Aires expidió un auto contra los curanderos. En esa época eran 26 los médicos que había en esa ciudad: de estos, cinco extranjeros, los demás españoles o hijos del país. En 1805, la Real Audiencia

⁶ *Recopilación de leyes de los Reinos de la Indias...*, pág. 181.

de Charcas suspendió del cargo de médico titular de Oruro, José de Ahumada, por haberse dedicado a las minas.

2.2.3. *Época republicana*

El paso del sistema colonial, en el que los organismos del poder en Charcas se hallaban bajo la dependencia de España, al sistema republicano, en el cual la ciudadanía boliviana podía tomar sus propias decisiones, marca un cambio fundamental en la historia de nuestro país.

En cuanto a la enseñanza médica y el ejercicio profesional, cuestiones tan importantes y tan distintas una de otra, en el curso de los años se las consideró y reglamentó íntimamente ligadas. Los decretos, casi uniformemente comprendieron a ambas y los organismos y las autoridades que las rigieron, las fiscalizaron también al mismo tiempo.

Al nacer la República, tanto Simón Bolívar como Antonio José de Sucre dictaron seis decretos con los que se crearon los Colegios de Ciencias y Artes en cada capital de departamento, por decreto de 11 de diciembre de 1825, dándose así el respaldo legal al inicio de los estudios de medicina. Entre las siete cátedras a fundarse se incluyó la de «Medicina». Los alumnos serían escogidos: veinte entre los «huérfanos de las víctimas de la revolución» y doce entre los «indigentes»; ninguno tendría menos de doce años ni más de veinte; deberían «saber leer y escribir»⁷.

Los alumnos debían vestir «uniforme y decentemente, casaca, pantalón, medias, corbata negra, sombrero redondo con la escarapela nacional».

Tal fue el primer paso dado en el período republicano hacia la enseñanza de la medicina. Una enseñanza elemental, sin duda, cuando no se exigía más preparación que la de saber leer y escribir, e, indiferentemente, una edad comprendida entre los doce y los veinte años.

⁷ Colección oficial de leyes, decretos, resoluciones que se han expedido para el régimen de la República boliviana. Tomo 1, 1825-1828.

Por ley de 9 de enero de 1827 se dictó el Plan de Estudios para todos los ciclos. En el de los Colegios de Ciencias y Artes, las materias de enseñanza fueron: lenguas castellana, latina, francesa e inglesa, poesía, retórica, filosofía, jurisprudencia y **medicina**⁸.

El curso de Medicina se dividió en ocho partes:

1. Anatomía general y particular.
2. Fisiología e higiene.
3. Patología y anatomía patológica.
4. Terapéutica y materia médica.
5. Afectos quirúrgicos, afectos médicos y obstetricia.
6. Clínica quirúrgica-médica.
7. Medicina legal y pública.
8. Materia farmacéutica y farmacia experimental.

En el Colegio de la «capital de la república» se dictarían algunas materias más; entre ellas: Química y Botánica. Los profesores se dividirían en secciones, correspondiendo la quinta a los médicos y farmacéuticos.

Al instalarse la República, las medidas del Real Protomedicato no estaban vigentes desde 1822 en España y tampoco en sus colonias.

El Protomedicato se puso en vigencia en Bolivia con el Decreto de 6 de abril de 1830, firmado por Andrés de Santa Cruz, que en sus consideraciones sustentaba: «1) que la salud y la vida de los ciudadanos nos han llamado siempre e imperiosamente la atención de un Gobierno ilustrado, y 2) que ellos estaban confiados a los profesores de medicina, cirugía y farmacia, cuya instrucción y moralidad deberá ser probada». Para cuyo efecto se erigía un Tribunal de Protomedicato con residencia en la ciudad de La Paz.

Jerárquicamente bajo el Protomedicato existían las tenencias del Protomedicato en todas las capitales del Departamento con las atribuciones de exigir, dentro de cierto plazo, el título o diploma profe-

⁸ *Ibidem.*

sional que acreditase como tal a todo médico cirujano o farmacéutico residente dentro del territorio nacional.

Director y catedráticos del Colegio de Medicina componían el Protomedicato y de éste dependían, como Tenientes, los médicos titulares de las capitales de departamento. Todos los profesionales (médicos, cirujanos, farmacéuticos) exhibirán ante este tribunal —el Protomedicato— los títulos que los habiliten para la actividad profesional. Ninguno que viniera al país podría ejercer su profesión sin comprobar su idoneidad. Los mismos egresados de los Colegios serían examinados por el Protomedicato, además de exhibir los documentos legales que «acrediten su buena conducta política y moral». El Protomedicato quedó encargado de expedir el título en «papel del sello segundo para los médicos y en el del tercero para los cirujanos y farmacéuticos». Debía, además, conocer por sí o por sus tenientes «de los crímenes o faltas profesionales de las tres clases de facultativos (médicos, cirujanos y farmacéuticos)», visitar por sí o sus tenientes las boticas, controlar la venta de drogas, especialmente las tóxicas⁹.

Por ley de 31 de octubre de 1833 y reglamento de 24 de enero de 1834, el Colegio General de Ciencias Médicas de La Paz tomó personería propia en el seno de la Universidad Mayor de La Paz. Hasta entonces se trató de un simple curso, integrante del Colegio de Ciencias y Artes. El Colegio se dividió en cuatro cátedras: Medicina, Cirugía, Farmacia y Química. Para ser admitido como alumno debía reunirse las siguientes condiciones: haber estudiado Gramática castellana y latina, Lógica, Ética y elementos de Matemáticas¹⁰.

El Protomedicato no había correspondido a los objetos de su erección por defecto de la forma en que fue establecido. Se lo reorganizó, por Decreto de 22 de agosto de 1843, sus atribuciones difirieron muy poco de las ya fijadas, añadiéndose las de «proponer los médicos titulares; cuidar que los médicos no vendan drogas ni tengan boticas en sus casas, ni celebren pacto alguno con boticario; formar las tarifas de las boticas y los aranceles que rijan las visitas

⁹ BALCÁZAR, JUAN MANUEL, *Historia de la medicina en Bolivia*. Ediciones «Juventud». La Paz-Bolivia, 1956, págs. 335, 336.

¹⁰ «Colección oficial de leyes...», *op. cit.*, Tomo 3, segundo vol. 1833, 1834 y hasta la instalación del Congreso de 1835.

y operaciones médicas, quirúrgicas u obstétricas; denunciar el ejercicio no autorizado de la profesión; examinar a los alumnos aspirantes a médicos, cirujanos o farmacéuticos; recibir el juramento de los mismos». Se fijó como sede la ciudad de Sucre y como local el salón de la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, donde funcionó hasta 1850 en que el titular, Doctor Manuel A. Cuéllar, fue suspendido de su cargo, quedando éste en acefalía y encargando sus atribuciones a las Tenencias. Ocho años y medio el país estuvo sin el Tribunal regulador del cuerpo médico, sin los funcionarios que vigilando sobre las tenencias resguardasen la salubridad hasta el 3 de agosto de 1859 en que el presidente de la república, José María Linares, resolvió llamar al Doctor Cuéllar a desempeñar el mismo puesto, quien cumplió sus funciones hasta el 31 de diciembre de 1866¹¹.

En aquel receso del Protomedicato se cometieron muchos atropellos y arbitrariedades en aprobaciones, licencias y autorizaciones del ejercicio profesional como de los nombramientos de los cargos.

Por primera vez apareció mencionado, en el decreto de 1843, con el nombre de «propina», el impuesto que debían pagar para ejercer una u otra de las tres profesiones (medicina, cirugía, farmacia), de 50, 40 y 30 pesos, respectivamente, «propina» que serviría, con el producto de las multas por otros conceptos, para formar el «fondo propio» del Protomedicato. Otro impuesto indirecto fue el uso de papel sellado, de segundo y tercer sello, como ya se ha visto.

Por este tiempo se notó un especial interés por dar la importancia debida y por independizar los estudios de Farmacia. Aun cuando desde la fundación de los Colegios de Ciencias, en 1825, se estableció la enseñanza de la farmacia, el grado universitario de Farmacéutico fue creado en el Estatuto «Melgarejo» (1864). Desde la colonia, los expendedores de drogas y despachadores de recetas seguían siendo los «boticarios», llamados también «apotecarios», simples prácticos con alguna experiencia adquirida en los hospitales y cuyo número iba creciendo con la atención de la clientela diaria; o farmacéuticos extranjeros, de dudosa idoneidad. Sabían de todo y aconsejaban sobre todo: la política, las cuestiones familiares, el mo-

¹¹ BALCÁZAR, JUAN MANUEL, «Historia...», *op. cit.*, págs. 345, 346.

vimiento de los astros en estrecha relación con la presentación de las enfermedades. Curaban y atendían consultas, sin que autoridad alguna se atreviera a observar tan múltiples funciones.

El Protomedicato pretendió acabar con semejante irregularidad. Comenzó por exigir la regencia de las «boticas» sólo por farmacéuticos titulados. No habiéndolos entre los nativos, fue necesario habilitar a los que parecían más prácticos, con más años de experiencia, o a los estudiantes que voluntariamente querían dirigir sus pasos hacia la nueva profesión; o, finalmente, llamar a los farmacéuticos extranjeros, a condición de que trabajen sólo como farmacéuticos y no como médicos. Quiso evitar el empirismo farmacéutico y volvió a caer en la condescendencia de permitir el ejercicio de la profesión a los «más prácticos», a los de «más experiencia» y aun a los «estudiantes», es decir, siguió fomentando el empirismo.

Entre los farmacéuticos extranjeros llegó a La Paz Domingo Lorini, de quien puede decirse que fue el fundador de los estudios farmacéuticos en esta ciudad. Fue profesor de Química de la Facultad de Medicina y en esta condición fundó, en 1888, un curso de Farmacia. Un solo alumno, Evaristo Valle, se inscribió y concluyó sus estudios en 1891. Otros alumnos siguieron su ejemplo y los cursos se regularizaron poco a poco. El programa de estudios fue el vigente en todas las Facultades del país.

La ley de 4 de diciembre de 1893 creó los Tribunales Médicos en las capitales de departamento y tácitamente canceló el Protomedicato y sus Tenencias; las atribuciones de éstos pasaron a integrar las de los nuevos organismos. Cada tribunal constaba de tres miembros, nombrados por el cuerpo médico de cada capital, asociado al Consejo Universitario; el gobierno expedía los nombramientos. Por primera vez intervino directamente el cuerpo médico en las designaciones y prácticamente, el Ejecutivo delegó en él su atribución constitucional de nombrar funcionarios¹².

Las obligaciones nuevas para los Tribunales Médicos fueron las de formar parte de los tribunales examinadores que recibían las pruebas de los alumnos egresados; revisar diplomas de médicos,

¹² «Colección oficial de leyes...», *op. cit.* Tomo 11.

farmacéuticos, oculistas, dentistas, tocólogos, matronas, flebótomos, etc., y en su caso, someterlos a exámenes; visitar las boticas por lo menos semestralmente asociado a la comisión municipal; dictar de acuerdo con las municipalidades, el reglamento de boticas en su respectiva circunscripción; formar el petitorio farmacéutico al que deben sujetarse los boticarios; prohibir la venta de remedios secretos o nuevos que no estén autorizados por el tribunal; requerir el auxilio de la fuerza pública para hacer efectivas las disposiciones de la ley.

Otra vez entraban en competencia las universidades con los tribunales médicos, sucesores del Protomedicato y sus Tenencias.

Con el propósito de remediar tan serios inconvenientes, se dictó el decreto de 25 de abril de 1898, que dio al país un Reglamento Orgánico de la Facultad Oficial de Medicina, formulado por el Instituto Médico «Sucre» y revisado por las Universidades de Chuquisaca y La Paz. Este reglamento remozó todo el régimen de enseñanza, poniéndolo en condiciones de competir con los de países más avanzados y eliminó la injerencia de las Facultades en el contralor de tantos otros servicios.

La enseñanza profesional de la Farmacia se sujetará al siguiente plan:

Primer año: Química inorgánica y analítica; Física experimental práctica en los laboratorios; Práctica oficinal.

Segundo año: Química orgánica y analítica; Botánica y Zoología; Práctica en laboratorio; Práctica oficinal.

Tercer año: Toxicología; Farmacia galénica; Práctica oficinal.

Cuarto año: Materia médica; Hidrología; Posología; Práctica oficinal.

Con todo, tan excelentes normas de conducta y tan meditado plan no pudieron imponerse con facilidad en el medio ambiente, ya bastante viciado; ni el material de trabajos prácticos existía completo, como dejaba suponer el plan. La independencia de los actos universitarios y de los tribunales médicos fue aprovechada para evitar un contralor directo.

Una anormalidad frecuentemente observada era la regencia de una farmacia por un médico, o la participación de éste en una so-

ciudad que negocia con la venta de medicamentos. En 1903, semejante dualidad de funciones se había hecho tan frecuente que fue necesario consultar al Poder Ejecutivo sobre cuál sería la norma de conducta para acabar con la irregularidad. La respuesta, previa «vista» del Fiscal, recordó, en fecha 10 de julio de dicho año, el texto de la prescripción del Código y después de consideraciones oportunas, declaró que «ningún médico en ejercicio de la profesión puede ser, ni directa ni indirectamente, interesado en los negocios de una botica».

Por decreto de 21 de septiembre de 1929, se aprobó el Reglamento de Farmacias, fijando las siguientes normas para el ejercicio de la profesión: **«sólo podrán establecer nuevas farmacias los farmacéuticos que posean diplomas otorgados o revalidados por las facultades establecidas por ley»**. El hecho de que la disposición alcanzó sólo a las «nuevas farmacias», mientras concedía el plazo de un año para que las existentes se coloquen en dichas condiciones normales, permitió numerosas transgresiones.

El reglamento quiso restringir el clandestinaje y entre otras medidas, concretó las siguientes:

«El despacho y venta de productos medicinales sólo podrá hacerse en las farmacias; fuera de éstas se considerará ejercicio ilegal de la farmacia; ningún farmacéutico podrá dirigir más de una sola farmacia, estando obligado a la atención personal y efectiva del establecimiento; el farmacéutico es responsable de todas las faltas cometidas en su despacho; salvo los casos de intervención del Inspector de Farmacias, no podrán revelar, sin orden judicial, el contenido de las recetas; queda prohibida la asociación del médico y del farmacéutico para explotar sus profesiones, así como el establecimiento de consultorios médicos en las farmacias o en locales que tengan comunicación con ellas»¹³.

Este reglamento fue sustituido por el de 25 de enero de 1939, documento modernizado y más completo que el anterior, si bien, en lo concerniente al ejercicio profesional del farmacéutico, sin ninguna adición de importancia.

¹³ «Colección oficial de leyes...», *op. cit.* Tomo 19.

En julio de 1943 se realiza en la ciudad de La Paz el Primer Congreso Químico-Farmacéutico Boliviano, por iniciativa del Sindicato Químico-Farmacéutico de dicha ciudad y bajo los auspicios del Ministerio de Trabajo, Salubridad y Previsión Social.

Entre las principales resoluciones de este Primer Congreso figura la creación de la Sociedad Boliviana de Química y Farmacia y la aprobación del Estatuto respectivo.

Por Decreto Supremo número 1811, de 26 de noviembre de 1949, se declara Día del Farmacéutico el 1.º de diciembre.

El 28 de septiembre de 1950 se emite la Resolución Suprema número 39.990, que prohíbe a los profesionales farmacéuticos, químico-farmacéuticos y bioquímico-farmacéuticos, el ejercicio de doble dirección y regencia de farmacias, boticas, droguerías o casas importadoras en todo el territorio de la república.

Se sanciona, el 10 de octubre de 1952, el Decreto Supremo número 3.205, que determina la obligación de las farmacias de la república para cumplir turnos dominicales y nocturnos. En el mismo propósito de regular estos servicios deben citarse dos decretos dictados el 6 de enero de 1953, disponiendo el primero, con registro número 3.289, la puesta en vigencia del Reglamento de Laboratorios Farmacéuticos, Analíticos y mediante registro número 3.221, que pone en vigencia el Reglamento de Farmacias, ambos cuerpos normativos redactados por el Ministerio de Higiene y Salubridad¹⁴.

El 4 de noviembre de 1960, por Decreto Supremo número 5.626, se establece que a partir del 1 de diciembre, todas las drogas y especialidades farmacéuticas que se expenden en las farmacias deben llevar con carácter obligatorio un timbre con el precio máximo. Un año después, el 24 de noviembre de 1961, el Decreto Supremo número 5.931, que a objeto de defender la economía del pueblo autorizaba al Ministerio de Salud Pública la apertura de una o varias droguerías bajo la dependencia de la Dirección del Servicio Químico Farmacéutico Nacional del despacho de Salud Pública¹⁵.

¹⁴ COSTA ARDUZ, ROLANDO, *Historia del Ministerio de Salud y Previsión Social*. Financiamiento OMS/OPS, 2000, pág. 91.

¹⁵ «Colección oficial...», *op. cit.* Tomo 35.

A objeto de favorecer a la Federación Departamental de Bioquímicos y Farmacéuticos para que cuenten con una sede social, mediante Decreto Supremo número 6.180, de 16 de agosto de 1962, se autorizó hacer efectivo el aporte voluntario consignando el 1 por 100 sobre facturas de venta en farmacias¹⁶.

Una importante disposición vinculada a recursos humanos dependientes del sector fue dictada el 25 de marzo de 1964, corresponde al Decreto Supremo número 6.728, que establecía la incompatibilidad en el horario de trabajo a médicos, odontólogos y farmacéuticos que prestan servicios al Estado, no pudiendo acumular más de ocho horas de trabajo con opción al ejercicio libre de la profesión, en tanto la labor docente universitaria no era incompatible con la actividad funcionaria, estableciéndose el plazo máximo de 30 días para regularizar la situación de los profesionales¹⁷.

En materia de ordenamiento debe consignarse el Decreto-Ley número 7.411, de 1 de diciembre de 1965 que aprueba, en los 126 artículos de que consta, el Reglamento General de Farmacias y Laboratorios, redactado por el Ministerio de Salud Pública y aprobado por el Tercer Congreso Nacional de Bioquímicos y Farmacéuticos realizado en el mes de septiembre de 1964 en Santa Cruz. Mencionamos algunas de sus medidas:

«Corresponde al profesional farmacéutico la responsabilidad ética y legal, en la elaboración, almacenamiento, conservación y expendio de especialidades farmacéuticas, productos químicos y drogas en general, preparaciones oficiales y magistrales de uso humano, veterinario y cosmético; se considera que ejercen ilegalmente la profesión Bioquímico-Farmacéutica: las personas que sin haber llenado las prescripciones del presente Reglamento ocupen el lugar del profesional en la Farmacia, en el Laboratorio o en las firmas importadoras de especialidades farmacéuticas, o que sin tener Título de Bioquímico o Farmacéutico y sin la autorización del Ministerio de Salud Pública se dedique a la elaboración, fabricación, envasado o fraccionamiento de medicamentos; se reconoce la exis-

¹⁶ «Colección oficial...», *op. cit.* Tomo 36.

¹⁷ «Colección oficial...», *op. cit.* Tomo 38.

tencia de la Confederación Nacional de Farmacia y Bioquímica, integrada por las Federaciones Departamentales como institución directriz de la clase farmacéutica del país, destinada a procurar el adelanto de la ciencia farmacéutica, a velar por el decoro y dignificación de la profesión y a fomentar nexos de solidaridad entre los profesionales que la componen»¹⁸.

El Decreto Supremo número 10.083, de 14 de enero de 1972, dio lugar a la creación del Colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia en base a la Confederación Nacional de Farmacia y Bioquímica, estableciendo la colegiación obligatoria; es en 21 artículos que se exponen las particularidades organizativas de la nueva entidad¹⁹.

Con el fin de preservar el prestigio y decoro del ejercicio de la profesión Bioquímico-Farmacéutica, en el ámbito de sus importantes funciones en el territorio nacional y con el espíritu de exigir el cumplimiento de la disciplina, respeto y honestidad en todos y cada uno de sus miembros; el Colegio de Bioquímica y Farmacia establece el CÓDIGO DE ÉTICA, instrumento destinado a orientar e indicar normas de conducta en el marco ético y moral, como también a imponer sanciones por faltas cometidas en el ejercicio de la profesión, en contra de los intereses materiales y morales de las instituciones y las personas que conforman la comunidad Bioquímico-Farmacéutica.

Una disposición vinculada al problema de dotación de medicamentos está dada por el Decreto Supremo número 19.937, de 12 de diciembre de 1983, estableciendo que mientras el Honorable Congreso Nacional sancione el Código de Salud, para normar la adquisición de medicamentos, se autoriza al Ministerio de Salud importar los productos farmacéuticos, suministrándolos y distribuyéndolos a las farmacias del país²⁰.

La Ley número 928, de 9 de abril de 1987, dio lugar a la creación del Instituto Boliviano de Medicina Tradicional Kallawayaya, con au-

¹⁸ *Ibidem.*

¹⁹ «Colección oficial...», *op. cit.* Tomo 43.

²⁰ MENDIZÁBAL LOZANO, GREGORIO, *Historia de la Salud Pública en Bolivia*. La Paz, Bolivia Offset Prisa Ltda., 2002, pág. 312.

tonomía propia y gestión administrativa, cuyas actividades debían estar enmarcadas dentro de las políticas formuladas por el Ministerio de Previsión Social y Salud Pública como cabeza del sistema.

La Ley del Medicamento número 1.737, sancionada el 17 de diciembre de 1996, y su Decreto Supremo Reglamentario número 24.672, de 21 de junio de 1997, se constituyen en la norma legal vigente hasta la fecha. Esta disposición, que alcanza a 144 artículos, se expone en 22 capítulos que tratan de la política nacional del medicamento, ámbito de aplicación, registro sanitario, control de calidad de medicamentos, industria farmacéutica, comisión farmacológica nacional, formulario terapéutico nacional, farmacovigilancia y establecimientos farmacéuticos. Por la importancia que reviste este capítulo mencionamos algunos de sus artículos:

«Artículo 29.º La Secretaría Nacional de Salud otorgará autorización para la instalación, traslado y/o transferencia de un establecimiento farmacéutico de acuerdo al reglamento de la presente ley. Los establecimientos farmacéuticos serán: a) Privados: 1. De un profesional bioquímico y/o farmacéutico. 2. De sociedades integradas por bioquímicos y/o farmacéuticos. 3. De otro tipo de asociaciones que deberán contar con la regencia de profesionales bioquímicos y/o farmacéuticos responsables de la adquisición y comercialización de los productos farmacéuticos. b) Farmacias populares. c) Farmacias institucionales y hospitalarias. d) Boticas. e) Droguerías.

Artículo 30.º Las farmacias estarán bajo responsabilidad permanente de regentes que serán bioquímicos y/o farmacéuticos, quienes serán responsables ante las autoridades del cumplimiento de las disposiciones señaladas en la presente Ley y su reglamento»²¹.

A partir de la aprobación de esta Ley, cualquier persona ajena a la profesión puede ser propietaria de una oficina de farmacia.

²¹ COSTA ARDUZ, ROLANDO, «Historia...», *op. cit.*, pág. 253.

4. CONCLUSIONES

- La profesión farmacéutica, por su propia naturaleza, desde sus inicios presentó una ambivalencia entre el aspecto científico y el comercial.
- Es necesario que los códigos de ética y deontología establezcan con claridad aquello que está permitido y debe ser alentado, aquello que no es permisible y debe ser prohibido y que no haya lugar para la confusión.
- La conducta del profesional farmacéutico debe ser ética, independiente, reconocida por la sociedad, aunque muchas veces esto signifique perder dinero, estatus y beneficios.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABECIA, V. (1939). *Historia de Chuquisaca*. Con una monografía contemporánea por Nicanor Mallo y Faustino Suarez. 4.º Centenario de la Fundación de La Plata Sucre, Editorial Charcas.
- (2) ACOSTA, R. P. J. DE (1962). *Historia Natural y Moral de las Indias*. México, Fondo de Cultura Económica.
- (3) BALCÁZAR, J. M. (1956). *Historia de la Medicina en Bolivia*. La Paz, Ediciones «Juventud».
- (4) CALANCHA, F. A. DE LA (1638). *Crónica moralizadora del Orden de San Agustín en el Perú*.
- (5) COBO, B. (1653). *Historia del Nuevo Mundo*.
- (6) COSTA ARDÚZ, R. (2000). *Historia del Ministerio de Salud y Previsión Social*. Financiamiento OMS/OPS.
- (7) D'ORBIGNY, A. (1830). *Viaje a la América meridional*.
- (8) GRACILAZO DE LA VEGA, I. (1609). *Comentarios Reales de los Incas*.
- (9) INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (1999). *Anuario estadístico. Rumbo al Censo 2001*.
- (10) LOAYZA, J. (1998). *La Universidad de Charcas. Universidad de San Francisco Xavier de Chuquisaca*. Sucre. Talleres Gráficos de la Imprenta Universitaria.
- (11) LOZA-BALSA, G. (1995). *Enciclopedia de la Medicina Aymara*. Vol. I (OPS/OMS). La Paz. Offset Prisa Publicidad.
- (12) MENDIZÁBAL LOZANO, G. (2002). *Historia de la Salud Pública en Bolivia*. La Paz, Bolivia Offset Prisa Ltda.
- (13) MOLINA OSSIO, G. (2001). *Normas del Sistema de Salud en Bolivia*. Recopilación. Honorable Senado Nacional.
- (14) MONARDES, N. (1580). *De las cosas que tienen nuestras Indias Occidentales y que sirven al uso de la medicina*.

- (15) OBLITAS POBLETE, E. (1963). *Cultura Kallawaya*. La Paz. Talleres Gráficos Bolivianos.
- (16) OBLITAS POBLETE, E. (1969). *Plantas Medicinales de Bolivia*. Farmacopea Kallawaya. La Paz. Editorial Los Amigos del Libro.
- (17) PUERTO SARMIENTO, F. J. (1997). *El mito de Panacea. Compendio de Historia de la Terapéutica y de la Farmacia*. Madrid, Ediciones Doce Calles, S. L.
- (18) RUA, M. C. (1990). «Vicisitudes en los primeros años de la Facultad de Medicina», en *Boletín del Centro Bibliográfico, Documental, Histórico de la Universidad de Chuquisaca*. Imprenta Universitaria.

————— *Necrológica* —————

**Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo.
Señor Don Pablo Sanz Pedrero**



El Excmo. Señor don Pablo Sanz Pedrero nació en Piñel de Abajo (Valladolid), el 30 de junio de 1921. Tomó posesión como Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Medalla número 22, con el discurso titulado: «*Desarrollo y alcance de las nuevas técnicas polarográficas*», el día 16 de junio de 1983.

Falleció el día 10 de junio de 2004 en Valladolid. La Sesión Necrológica en su honor se celebró el día 3 de febrero de 2005, presidida por el Excmo. Señor don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, en la que intervinieron los siguientes ponentes: Excmo. Señor don Vicente Vilas Sánchez, don José Miñones Trillo, don Manuel Domínguez Carmona y doña M.^a Teresa Miras Portugal.

Don Pablo Sanz, mi profesor

VICENTE VILAS SÁNCHEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente, Excmo. Señor Presidente Honorario, Excelentísimas Señoras y Señores Académicos. Excelentísima Señora Doña Mercedes Pastor, viuda de Sanz, familiares, amigos, discípulos, Señoras y Señores:

Nos reunimos aquí, dentro de este marco académico, en esta brillante sala adornada con las galas de rigor, aunque en nuestros corazones y en lo profundo de nuestra mente la sentimos tapizada y orlada de crespones, sumida en un respetuoso silencio, pues el acto que nos convoca es, en sí, muy triste, y nos llena de congoja. Es llorar por la desaparición de un gran amigo para unos, un maestro para sus discípulos, y también un buen compañero para el resto de Académicos, una imprescindible persona para sus familiares. Me refiero a nuestro ínclito Don Pablo Sanz Pedrero, del que vamos a rememorar su persona y dedicarle un cariñoso recuerdo.

Mucho ha perdido, con su desaparición, la Academia, la Universidad, la profesión farmacéutica, como pionero en la Óptica Farmacéutica, un gran analista farmacéutico, etc. Pero de todos, la persona que más ha perdido sois vos, Doña Mercedes Pastor, viuda de Sanz, pues se ha truncado el gran proyecto de vida que emprendisteis, hace casi cincuenta años, de la que soy testigo en la enorme ilusión que teníais cuando me recibisteis en vuestra nuevo domicilio de la calle Galileo, y me prodigasteis tanta amabilidad y atención, y así a lo largo de toda vuestra vida habéis dado la talla de una esposa

ejemplar, llena de proyectos acompañando a Pablo en todo momento, desde Madrid a Santiago, en la Cátedra, en el Rectorado, y de nuevo en Madrid, en la Academia, y por último, soportando con gran entereza y realismo el amargo calvario de su enfermedad, y por último la sabia decisión de retiraros a Valladolid, vuestra tierra de origen, para recogeros en vuestro entorno familiar.

Se lee en el Eclesiastés 24-2. 8-12: «La sabiduría se alaba a sí misma, se gloria en medio de su pueblo, abre la boca en la asamblea del altísimo y se gloria dentro de sus potestades. En medio de su pueblo será ensalzada y admirada en la congregación plena». Esta alabanza que se hace de la sabiduría se presenta como don explícito de Dios a los hombres, pero esta virtud se modela con la meditación, el trabajo y el estudio, es un bien que es dado a todos, pero que hay que consolidar, elaborar y fomentar, para lo cual hace falta una decidida vocación y un esfuerzo permanente. Es lo que he sentido en todos, los que fueron mis profesores y maestros, pues me consta que siempre se esforzaron en acumular conocimientos, para transmitirlos actualizados y haciéndolos asequibles al alumnado. Esto fue para mí el espejo y referente en mi futura vida docente.

Corría el año 1951, cuando llegue a la Facultad de Farmacia, de Madrid, coincidiendo con Amadeo Llano, el que sería mi compañero inseparable durante mi vida de alumno y posterior amistad consolidada en el tiempo. Ambos participamos en el laboratorio de fotografía con Don José Luis Montero de Espinosa como Dibujante de la cátedra y ayudantes de prácticas de la asignatura de Técnica Física, de la que era titular el Profesor Portillo, Académico que fue de esta corporación, y Don Pablo Sanz, adjunto numerario de la misma.

Allí comenzó nuestro contacto con el Profesor Sanz Pedrero, que acababa de regresar de su estancia en Suecia, en el «Kemikun Institut», trabajando en las modernas técnicas analíticas bajo la dirección del profesor Claesson. El director emérito del Instituto y premio Nóbel, Doctor Sveverg, tuvo la gentileza de invitarle junto al Profesor Ortega a una comida de cortesía, que celebró con ambos becarios españoles, en donde tuvieron la oportunidad de conocer personalmente a una figura tan importante de la ciencia.

En Madrid, le vimos dirigir la organización de las prácticas, de la asignatura de Técnica Física, con la colaboración del profesor Señor Bas, en estos momentos ilustre farmacéutico de Santa Cruz de Tenerife, con sus indicaciones pasamos a instalar y montar los grupos necesarios para atender los casi seiscientos alumnos matriculados en la asignatura. Lo que supuso una compleja planificación, casi como una operación de estado mayor. De esta manera nos constituimos alumnos ayudantes y colaboradores, participando además en todos los trabajos que se desarrollaban en la cátedra, lo que fue para nosotros una oportunidad valiosísima en nuestra formación, que habría de marcar nuestra orientación futura.

El Profesor Sanz, siguiendo la trayectoria marcada por el Profesor Portillo en el campo electroquímico de la polarografía, dirigió sus trabajos en esa técnica analítica. Comenzó trabajando con un polarógrafo del antiguo centro Rockefeller, según las técnicas de gota pendiente de mercurio ideada por Heyrosky. Después se adquirió un moderno polarógrafo Radiometer, por el singular aporte que a la investigación hizo el Profesor Don José María Albareda, con cuyas técnicas se hicieron numerosas investigaciones que dieron como fruto importantes publicaciones.

Dirigió numerosas tesis doctorales destacando la del Doctor Don Joseph Benmaman, actualmente profesor emérito en la Universidad de Charlestown en Carolina del Sur, y la de Don Pedro Ramos Rodrigo, actualmente ilustre farmacéutico y óptico con ejercicio en Segovia, y de cuyo Colegio Oficial de Farmacéuticos fue hasta recientemente su Presidente, así como vocal del Consejo General de Colegios Farmacéuticos de España. Don Pablo trabajaba y hacía trabajar a todos los que estaban a su lado, de forma agotadora, sin límite para el descanso, llegaba a primera hora y salía siempre azuzado por los vigilantes Ezequiel y Donato, que cerraban la facultad.

Recuerdo con humor, que cuando se efectuaban unas investigaciones sobre el contenido de metales pesados como plomo, cadmio, etc., en diversos vinos españoles, Don Pablo recibió numerosas muestras para su estudio, originarias de diversas bodegas, y de alguna de las cuales dimos buena cuenta, y no especialmente analítica, sino más bien gustativa. Afortunadamente creemos que no se enteró.

Don Pablo, como le llamábamos los alumnos, tenía un carácter áspero y aparentemente difícil, pero en el fondo le reconocíamos como una muy buena persona. Se manifestaba contundente y claro, como buen castellano, pues nacido en Piñel de Abajo, en el corazón de esa recia tierra castellana, bañada por el Duero y que da los más afamados vinos y los mejores cereales, esta tierra rica y próspera, pero austera y noble, fue la que le modeló como persona exigente pero también condescendiente. Actuaba como el intermediario entre el venerado y solemne profesor Portillo, al que veíamos muy alejado y de difícil acceso, y nosotros.

Don Pablo, por su gran físico, nos imponía respeto, aún lo recuerdo con su gran presencia, cuando iba a dar la clase, le veíamos transitar por el pasillo con la bata abierta y flameante como una bandera al viento, y en su mano, un largo puntero en ristre, cual adarga de un caballero medieval, al inicio de un lance.

Durante el curso nos dio bastante clases teóricas, sobre todo de medidas eléctricas, así como también todas las clases de problemas. Confeccionó un libro de ejercicios prácticos, muy completo, con las descripciones de las experiencias, los métodos operativos, y la relación del material imprescindible, así como con una hoja en cada práctica para la presentación de los resultados y su análisis. Dicho manual constituía un verdadero libro docente de experiencias sobre esta asignatura.

Me viene a la memoria la anécdota de que estando en Zaragoza con mi familia durante las vacaciones de verano, fui a visitar la Facultad de Ciencias, saludando en su despacho al catedrático de electricidad y magnetismo Señor Don Juan Cabrera y Felipe. Me preguntó por la vida en Madrid y por mi Facultad, por la que se tomó mucho interés, aproveché para enseñarle la guía de prácticas, anteriormente comentada, que la ojeó detenidamente y añadió: «Esta es una gran asignatura, deberíamos tenerla en la licenciatura de físicas», esto me llenó de satisfacción por la valoración que hacía personalidad científica tan relevante.

En un viaje de corta duración que nos hizo el Profesor Benman, nos comentó que el Libro de Técnica Física del Profesor Portillo y el de Prácticas de Don Pablo, le habían servido de valiosas

herramientas en la programación y diseño de sus enseñanzas en la Universidad Americana.

Aneas a las enseñanzas oficiales, se organizaron en la Cátedra unos cursos especiales orientados a la formación y actualización de los conocimientos sobre la Óptica Oftálmica, a instancias de numerosos farmacéuticos, pioneros en esa orientación profesional.

Siempre se entendió en la Cátedra que la Óptica Oftálmica era parte de las aptitudes y capacidades de los farmacéuticos, ya que la receta oftálmica emitida por un medico oculista, como prescripción médica, debería atenderse en el ámbito sanitario en la oficina de farmacia, pero para ello lo que faltaba era la formación técnica adecuada. Para cubrir esta ausencia es por lo que se organizaron estas enseñanzas para postgraduados, con la inestimable colaboración de ilustres profesionales, expertos en la Óptica Oftálmica en sus oficinas de farmacia, como Don Tiburcio Ellacuria, Don Ignacio Eguileor, Don Nilo Prieto, Don Ernesto Marco y otros, que colaboraron en las prácticas y experiencias, mientras que del aspecto teórico, en la sección de acústica, se encargó el Doctor Sanz, con el valioso apoyo de sus amistades personales de la casa Philips y mientras que de la óptica lo hacia el Doctor Ortega.

Nosotros, me refiero a Don Amadeo Llano y el que os habla, participamos en todas las actividades, con gran avidez en aprender todo lo que se hacía y enseñaba.

En los siguientes cursos que se vinieron repitiendo durante varios años, participaron otros profesores como la Doctora Doña Isabel Cayre, Don Carlos Areses, y otros profesionales.

Pasaron algunos años, y cambió el escenario de la Facultad. El Profesor Sanz marchó a Santiago como catedrático de Técnica Física y Fisicoquímica, de la que posteriormente fue Rector Magnífico de la misma.

Yo me fui a la Universidad de Barcelona, en donde también se daban unos cursillos de formación sobre Óptica, que había organizado el Profesor Doctor Raurich, en semejanza a los que se daban en Madrid. No obstante los profesionales farmacéuticos reclamaron de sus universidades que se consolidaran de alguna manera estas enseñanzas a la vista de posibles contenciosos.

Recuerdo que Don Pablo me llamó para decirme que un farmacéutico muy afín a estas inquietudes de la ciudad de Granada, el Señor Osorio, sugería que deberíamos visitar la Universidad de París y en su Facultad de Farmacia las instalaciones y los métodos didácticos de estas enseñanzas. Acepté gustoso, nos reunimos en París, donde hicimos acopio de información, libros y equipamiento para lo que sería nuestro futuro diseño de las enseñanzas. Anteriormente ya había estado el Profesor Ortega, recogiendo información y bibliografía en esa Universidad.

Con toda la información adquirida y con la experiencia que ya teníamos, proyectamos la creación de unas Escuelas de especialistas en Óptica-Oftálmica y Acústica Audiométrica para Farmacéuticos. Se diseñó el modelo legal de la creación de las mismas, y se sometió a la autoridad ministerial su aprobación. Hay que reconocer, como ya se ha hecho reiteradamente, el agradecimiento de la corporación farmacéutica a la personalidad de Don Federico Mayor, que siendo ministro no dudó en aceptar estas sugerencias, que se plasmaron en las órdenes ministeriales de su creación.

De esta manera se instituyeron las dos escuelas profesionales de Óptica Oftálmica y Acústica Audiométrica, la de Santiago bajo la quinta dirección de Don Pablo, y la de Barcelona de la que me encargó el Rector, Doctor Don Fabián Estapé.

Estas iniciativas tuvieron una cierta contestación de otras profesiones, por lo que se agruparon los nuevos ópticos farmacéuticos en una asociación que defendiera sus derechos, lo que impulsó la creación de una revista con la cabecera de «Audióptica» como órgano de expresión de nuestras inquietudes. De dicha Asociación se nombra a Don Pablo como presidente de la misma.

Por último comentaré una anécdota ocurrida más recientemente, cuando ya se disponía la familia Sanz a marchar a Valladolid. Fuimos Don Amadeo Llano y un servidor a despedirnos del matrimonio, a su casa, nos recibió Merche amablemente, como siempre, y nos dijo que Pablo estaba durmiendo, le rogamos que no lo despertara, pues por entonces sus facultades cognitivas estaban algo disminuidas, y podría darse el caso doloroso de que no nos reconociera, pero ocurrió todo lo contrario. Se despertó, se levantó y gritó: «pero si son Amadeo y Vicente». Salió y nos dio algo de conversación, cosa

que nos dejó profundamente conmovidos, pues nos recordaba como antiguos alumnos y sobre todo amigos. Cumpliéndose la sentencia de Elbert Hubbard, de que «Un amigo es uno que sabe todo de ti, y a pesar de ello te quiere». Para nosotros, que fue la última vez que le vimos, y nos viene a la memoria la reflexión de Jean de la Fontaine: «La amistad, como la sombra vespertina, se agranda en el ocaso de la vida».

Figura de Don Pablo Sanz en la Universidad de Santiago de Compostela

JOSÉ MIÑONES TRILLO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente, Excmos. Señores Académicos, Ilmos. Señores, Señoras y Señores.

Mi intervención en esta sesión en memoria de Don Pablo Sanz se va a limitar únicamente a describir su actividad universitaria desarrollada en Santiago de Compostela, en donde tuve la suerte de compartir con él catorce años de éxitos continuados en esta ciudad, en calidad de su discípulo más antiguo.

Conocí a Don Pablo en diciembre de 1964, con motivo de la oposición celebrada en Madrid para cubrir la plaza de Catedrático de Técnica Física y Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de Santiago. Se trataba de la primera vez que se convocaba una cátedra después de 18 años, tras conseguir el Profesor Otero Aenlle este nombramiento en 1946, precisamente para ocupar el mismo destino en la Universidad de Santiago. Por lo tanto, no es de extrañar que la plaza objeto de concurso estuviese muy concurrida, y que los concursantes fuesen todos ellos de calidad contrastada. Don Pablo se alzó con la misma en legítima competencia, y en enero de 1965 se presenta en Santiago, acompañado de su esposa Mercedes, su *alter ego*. La prensa local anuncia su llegada y en el Salón Artesonado de la vieja Fonseca, verdadera joya del arte mudéjar, pronuncia su lección inaugural ante el Rector de la Universidad, el Profesor Echeverri. Todavía hoy tengo el recuerdo de aquella lección sobre Audiometría, en donde, con toda claridad, nos habló de conceptos tales como

intensidad, tono, timbre, decibelios, síntesis de Fourier, presbiacusia, ultrasonidos, etc.

Se integra rápidamente en la vida social y en el ámbito universitario de Compostela. Al tiempo que se hace socio del Aeroclub, practicando el tenis, primero, y el golf, después, y en donde es miembro activo de la tertulia conocida coloquialmente como la del «Senado», en la que participan profesores universitarios, médicos y otras personas representativas de la sociedad compostelana, se dedica con entusiasmo a su labor docente en la Facultad de Farmacia. Particularmente quiero destacar su enorme preocupación por conseguir que los alumnos disfrutasen de unas prácticas adecuadas a sus enseñanzas teóricas. No obstante, con los escasos medios económicos disponibles en aquella época, la adquisición de nuevos medios materiales para estos menesteres era una auténtica utopía, por lo que la única manera de confeccionar unas buenas prácticas consistía en agudizar el ingenio para lograr de forma artesanal el equipamiento instrumental necesario. Yo admiraba en Don Pablo la habilidad que se daba para fabricar un electrodo de calomelanos o para realizar el montaje de una pila Daniell —con puente salino incluido—, o cómo era capaz de transformar un termómetro roto en un estalagmómetro para la medida de la tensión superficial. En fin, en él se hacía realidad la frase atribuida a Lavoisier de que el hombre de laboratorio debe saber limar con una sierra y serrar con una lima, inculcando esta idea a todos sus colaboradores.

Esta alusión al viejo laboratorio de Fonseca, en donde inició Don Pablo las labores de su Cátedra, sirve de ilustración para resaltar la mejora que supuso el cambio de la sede de la Facultad a las nuevas instalaciones del Campus Sur, gracias a las gestiones de Don Pablo que, por aquel entonces, ya era Decano de Farmacia. Había llegado a Santiago seis años antes, había sido nombrado primer Director-Comisario de la Escuela de Arquitectura de La Coruña y, tras unas competidas elecciones con Don Rafael Cadórniga Carro como oponente, había sido elegido Decano en mayo de 1971.

Todo ello en un período de tiempo relativamente corto y en una Universidad en la que no se había formado. ¿Cómo era posible todo esto? En parte, debido a la hospitalidad de los gallegos, de los que con frecuencia se dice que no se sabe si «suben o bajan la escalera».

En mi opinión esto es así porque cuando se hallan en el rellano de la misma, sin subir ni bajar, es porque en esos momentos se encuentran abriendo la puerta de su casa a los que proceden de otros lugares. Y uno de estos era Don Pablo, que por su dinamismo, su inquietud, su vitalidad, por su forma de llamar las cosas sin dobleces ni retrueques y por su trato humano, cordial y afectuoso, despertaba la simpatía y cordialidad hacia su persona, haciéndose acreedor al nombramiento de Decano por todas estas virtudes, sin importar su procedencia. En aquella época en que la Facultad constituía el núcleo que coordinaba la organización docente y la investigación que se llevaba a cabo en las diferentes Cátedras, el Decano se preocupaba, no sólo de organizar las enseñanzas del Centro, sino también de adquirir recursos económicos para el desarrollo de la investigación. En este aspecto, Don Pablo siempre se caracterizó por prestar su apoyo a los Profesores noveles que despuntaban en la Facultad, dotándoles de equipamientos para sus investigaciones y prestándoles toda su ayuda para conseguir metas superiores. Creo no faltar a la verdad si incluyo en este apartado el reconocimiento a Don Pablo Sanz de los hoy en día catedráticos de la universidad compostelana, los Profesores Vila Jato, de Tecnología Farmacéutica; Calleja Suárez, de Farmacología; y Raviña Rubira, de Química Farmacéutica, además, naturalmente, del que os habla y del resto de los actuales catedráticos y titulares de Fisicoquímica de Santiago: Profesores Iribarnegaray Jado, Sandez Macho, Conde Mouzo, Gómez-Ulla y Cid Rey, así como de aquellos que actualmente se encuentran en otras universidades, pero a los que Don Pablo prestó su ayuda y apoyo en todo momento: Profesores López Fonseca, Casado Linarejos, Ríos Fernández, Cachaza Silverio, etc.

Sabiéndose rodear de un buen equipo de trabajo —alguno de sus colaboradores de aquella época nos acompaña en esta Academia, como es el caso del Profesor Antonio Martínez—, Don Pablo marcó un hito en la historia de la Facultad, logrando el apoyo de todos los estamentos: profesores, alumnos y personal de administración y servicios actuaban como un bloque homogéneo, sin fisuras, colaborando todos ellos en el gobierno de la Facultad. Echo de menos, hoy en día, las fiestas que en la Facultad organizaba el Decanato para recaudar fondos para el paso del ecuador o para el viaje fin de carrera y en las que la concurrencia era masiva, reuniéndonos todos

en íntima camaradería durante unas horas inolvidables. Del mismo modo, la fiesta de licenciatura de Farmacia era el modelo en el que se inspiraban las demás Facultades, ya que Don Pablo, con sus buenas dotes de gestor, había conseguido que fuese subvencionada por los Colegios Farmacéuticos de Galicia, tradición que todavía continúa estando vigente.

Para ser enteramente fiel a la realidad, debo decir que la unanimidad a la hora de aceptar las actuaciones de Don Pablo como Decano no fue absoluta, hecho que, por otra parte, resulta positivo, pues todos somos conscientes de los peligros que conllevan las adhesiones inquebrantables y las unanimidades absolutas. En este sentido, tengo que indicar que existía un viejo colega de Don Pablo que discrepaba de él de una manera evidente (a decir verdad, discrepaba de todos) e, incluso, diría que tenía a gala demostrar públicamente tal actitud, puesto que cuando subía a la tarima para dictar sus clases y se encontraba con el atril que había utilizado Don Pablo para sus explicaciones de la clase anterior, despectivamente lo desplazaba de un manotazo, significando con ello su rebeldía ante la autoridad del Decano y su desprecio ante la necesidad de éste de tener que utilizar unos guiones para sus explicaciones, algo que él tenía a gala de prescindir. Es obvio que toda esta actuación teatral era fomentada y jaleada por los alumnos que entre clase y clase recogían el atril que previamente el bedel había retirado de la mesa y lo colocaban encima de la misma para que el airado profesor realizase el número diario del «atrilazo» ante el regocijo de todos. No creo necesario relatar lo que sucedió el día en que los alumnos decidieron clavar el atril contra la mesa.

Después de tres años largos de Decano, Don Pablo pasó a ocupar el Rectorado de la Universidad de Santiago a finales de 1974. No es necesario indicar el orgullo que la nominación de Rector supuso para toda la Facultad, yo diría que incluso para su enojado colega. Por tercera vez en la Historia, un farmacéutico alcanzaba tan alto honor en una Universidad de algo más de 500 años, como es la de Santiago: el primero había sido el Profesor Casares Rodríguez, el progenitor de la saga de los Casares (Casares Teijeiro, Casares Bes-cansa, Casares Gil) y el segundo el Profesor Montequi, ambos catedráticos de Química Inorgánica.

El día de su toma de posesión como Rector, el 8 de enero de 1975, en un acto solemne presidido por el entonces Ministro de Educación y Ciencia, Don Cruz Martínez Esteruelas y con presencia del Subsecretario del Ministerio, Don Federico Mayor Zaragoza y del Director General de Universidades, Don Felipe Lucena, se inauguró el Palacio de San Jerónimo como nueva sede del Rectorado, cuya remodelación había sido emprendida por sus antecesores, los Rectores Echeverri, García Garrido, Masaguer y Lucas Álvarez, y que llevaba el camino de las grandes obras, de no rematar nunca, hasta que Don Pablo le dio el impulso final en menos de un mes. Se trata de un edificio emblemático, que configura con los otros tres existentes en la plaza del Obradoiro-Catedral a la derecha, Ayuntamiento y sede de la Presidencia de Gobierno Autónomo a la izquierda, y Hostal de los Reyes Católicos de frente, un conjunto arquitectónico único. Los poderes eclesiástico, autonómico, municipal, empresarial y universitario se dan la mano en esta majestuosa Plaza. Al año siguiente de su inauguración, Don Pablo consiguió que en la festividad del Apóstol, los Reyes de España visitaran el edificio, firmando en el libro de oro de visitas del Rectorado, como anteriormente lo hicieron la Reina Isabel II y los reyes Alfonso XII y Alfonso XIII.

Tengo que decir que Don Pablo fue un buen Rector, por no decir un magnífico Rector, ante el temor de que se interpreten mis palabras como fruto del sentimiento y no de la razón. Pero, en realidad, su actuación al frente del Rectorado bien podría merecer este calificativo que, por otra parte, era el que le otorgaba el Presidente del Colegio de Farmacéuticos de La Coruña quien, despreocupado del título honorífico que correspondía a la figura del Rector, iniciaba sus intervenciones diciendo: «Magnífico Rector Don Pablo». Sus múltiples obras así lo atestiguan, pero permítanme que sólo haga referencia a alguna de ellas, en aras a la brevedad de esta intervención. La espectacular expansión física experimentada por la Universidad Compostelana a lo largo de los últimos años se debe a la tenacidad de Don Pablo por preservar los terrenos del denominado «Bosque de la Condesa» para el desarrollo del actual Campus Sur, en el que se ubican la totalidad de las Facultades del área de Ciencias Experimentales, las de Ciencias de la Educación y la mayoría de los Institutos Universitarios. Y esto es así porque el Rector Sanz Pedrero se opuso rotundamente al cambio de uso de esos terrenos para fines

inmobiliarios, tal como pretendían los poderes económicos compostelanos, apoyados por la complacencia de los organismos públicos y amparándose en la coartada de que muchas de esas viviendas iban a ser destinadas al profesorado. Un conocido abogado santiagués, de mucho renombre por su habilidad para ganar todos los «pleitos» que defendía, se acercó un día al Rectorado para proponerle a Don Pablo que aceptase el cambio de uso de estos terrenos, llevándole un plano con las viviendas individuales a construir y ofreciéndole como recompensa la elección del chalet que desease para su uso particular. Como era de esperar, y conociendo el carácter de Don Pablo, el abogado salió despedido fulminantemente del despacho del rector. Pero lo cierto es que el hábil abogado, curtido en los oficios de su profesión, no aceptó el fracaso inicial y volvió al día siguiente para ofrecerle dos viviendas, en lugar de una, al considerar que el ofrecimiento del día anterior era escaso. Los improperios y los gritos del rector todavía se oyen hoy a través de los gruesos muros del Palacio de San Xerome.

La creación de la Escuela Profesional de Óptica Oftálmica y Acústica Audiométrica de Santiago fue una obra importante de Don Pablo en su época de Rector, tal como fue reconocida por el Consejo General de Colegios Farmacéuticos que le otorgó su medalla de oro. Tras superar obstáculos y barreras de todo tipo, esta institución se puso en funcionamiento en febrero de 1975, contando con la ayuda de los Colegios Farmacéuticos que financiaron el montaje de sus instalaciones. Después de años de espléndido funcionamiento, período en el se formó a un millar de especialistas, utilizando la metodología didáctica que bien podría considerarse precursora de la que hoy en día se emplea en los cursos «másters», pasó a transformarse en la actual Escuela Universitaria de Óptica y Optometría. Cuando por aquel entonces, los ópticos denunciaban la «anormal» competencia por parte de los especialistas formados en esta Escuela, Don Pablo decía con razón: «la única anormalidad de esta Escuela es su normal funcionamiento con el escaso presupuesto que dispone».

Don Pablo poseía un carácter fuerte. Se trataba de una persona de firmes convicciones que las defendía en cualquier foro y en cualquier circunstancia. Era tenaz, pero al mismo tiempo hábil, dialogante y persuasivo para conseguir lo que se proponía. Uno de los objetivos que se marcó en la última etapa de su vida universitaria

fue la de elaborar un libro de Físicoquímica dirigido a los alumnos de Farmacia y de Biología que cursan esta disciplina. Considerado como una quimera para muchos, logró su objetivo, y en 1992 la editorial Masson-Salvat publicó el libro «Físicoquímica para Farmacia y Biología», coordinado por el Profesor Sanz Pedrero, y en el que participaron profesores de esta área de conocimiento. Es de reconocer que en esta ingente labor contó con un escudero de lujo, el Profesor Don Salvador Senent, vallisoletano como él, docente entregado a la enseñanza de la Química Física, que se adhirió con tanto entusiasmo al proyecto como si fuese original de él mismo. Este hecho habla por sí sólo de la capacidad de liderazgo de Don Pablo en el ámbito de la Físicoquímica española.

No era amigo de homenajes; no le gustaban las bandas, ni las cintas, ni los colgajos. Pero, ahora que no nos puede escuchar, a este acto en su memoria no se puede oponer. Se trata de algo de obligado cumplimiento, aunque sólo sea para reconocer públicamente sus importantes aportaciones a la Universidad compostelana y, en mi caso y en el de muchos otros compañeros, para testimoniar nuestro agradecimiento por su interés, su apoyo, su esfuerzo y por todas las atenciones personales recibidas a lo largo de su vida. Me queda la pena de que en estos últimos años, debido a su enfermedad, no fuese consciente de este justo reconocimiento de sus discípulos y de que pudiese disfrutar del mismo. A los que como yo, nuestro futuro se va encaminando hacia el pasado, nos gusta rememorar éste para intentar conseguir un futuro mejor. Este acto de homenaje a Don Pablo es, precisamente, un acto de auténtica justicia para alcanzar ese futuro mejor.

Decía Camus: «lo difícil no es conseguir el éxito, lo difícil es merecerlo». Don Pablo Sanz lo ha merecido con creces. Para ello, los hados lo han llevado a Compostela a través de un largo y fructífero peregrinaje que dejaron profundas huellas de su impronta en la ciudad del Apóstol. Que el hijo del Trueno le guíe ante el Señor.

Profesor Pablo Sanz Pedrero, como Académico y Compañero

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Doctor Reol Tejada; Excmo. Señor Presidente, Honorario, Profesor Santos Ruiz; Excma. Secretaria de la Academia, Profesora Francés; Excma. Señora Mercedes Pastor, viuda de Sanz Pedrero; Excmos. e Ilmos. Señoras y Señores Académicos, Señoras y Señores.

Agradezco vivamente la confianza que la Junta de Gobierno ha puesto en mí, para glosar en la Academia la figura insigne del Profesor Sanz Pedrero como Académico y Compañero, para lo cual no puedo aportar más mérito que haber sido amigo suyo, mérito que todos nosotros ostentamos; amistad no sólo personal sino familiar, concretada en inolvidables cenas familiares en unión del Profesor Espinós, con nuestras esposas. Vaya aquí mi emocionado recuerdo por su definitiva ausencia, mi reconocimiento y gratitud a esa amistad, que continuamente me demostró desde que llegué a Santiago y me incorporé al claustro de Fonseca, de la Facultad de Farmacia.

Vamos a recordar a un hombre, a un ser como al que se refería Antígona cuando profirió: «Muchas cosas hay admirables, pero ninguna lo es más que el hombre», lo que Menarco corroboró al decir: «El hombre, qué cosa tan maravillosa, ¡si es verdaderamente un hombre!» El Profesor Sanz Pedrero era el prototipo de este verdadero hombre. Ingresó en la Real Academia de Farmacia, nuestra Academia, como Académico Correspondiente en 1963 de la mano de su maestro el Profesor Ramón Portillo, llevando en su enorme currículum el apren-

dizaje, recibido en Uppsala, del Profesor Swedberg, entonces doctor jubilar, título ligado a una antigua tradición sueca, premio Nobel de Química de 1926, siendo director de esta casa el profesor Montequi. Su asistencia y colaboración fue constante, sólo interrumpida por su etapa compostelana al ganar la Cátedra de Físico-Química y Técnica-Física de la Facultad de Farmacia de Santiago en donde, como nos ha recordado el Profesor Miñones, desarrolló una importante labor de la que destaco, porque lo fue en la consideración del Doctor Sanz Pedrero, la creación y puesta en funcionamiento de la Escuela Profesional de Óptica Oftálmica y Acústica Audiométrica, que es modélica de este tipo de enseñanzas, que sigue siendo hoy día una institución de la que la Universidad compostelana se siente orgullosa. Probablemente este mérito, junto con otros, fue determinante para que el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España concediera al Profesor Sanz su medalla de oro. Fue Decano de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela y de inmediato Rector de aquella Universidad en unos difíciles tiempos de la transición política en la que desarrolló una fecunda tarea.

En 1983 le cupo el honor y el orgullo de ser nombrado Académico de número de esta Real Academia, siendo Director el Profesor Santos Ruiz, maestro suyo. Su discurso titulado «Nuevas técnicas polarográficas» es un verdadero tratado científico de esta técnica de investigación para cuantificar y sobre todo para indagar las propiedades de las moléculas, tema elegido para honrar la memoria de su principal maestro, el Profesor Portillo. Cada vez que vengo a la Academia recuerdo, al pasar delante del bar de la esquina, la alegría con la que celebramos un grupo de íntimos el ingreso del nuevo Académico y la calidad de su discurso. Desde esa fecha, su asistencia fue constante, acudía los jueves con el Profesor Vían, al que le unía una gran amistad, grupo al que más tarde se amplió con otro compañero de viaje, el Profesor Gaspar González. Su participación en las actividades académicas fue entusiasta, a las que siguió asistiendo casi hasta el final. Aquí en la Academia, el Profesor San Pedrero pudo continuar su relación con otros inolvidables profesores procedentes de la Universidad compostelana; sería interesante saber porqué razón, y puedo asegurar que no se trataba de ningún tipo de presión, esa concentración de profesores compostelanos, entre los Académicos de número de los que desde que soy Académico recuerdo a vuela

pluma a Otero, Cadórniga, Cabezas, Domínguez Gil Urlé, Espinós, Ruiz Amil, Antonio Martínez, Giráldez, Serranillos, Miñones y yo mismo. Colaboró con los magníficos y sucesivos Presidentes de la Academia, los Doctores Santos Ruiz, Cadórniga, Villanueva y Reol. Mucho le gustaba al Profesor Sanz Pedrero destacar que tuvo el privilegio de ocupar un despacho en el Antiguo Colegio de Fonseca, creado en 1857, siendo ministro de Instrucción Pública Don Claudio Moyano Samaniego, curiosamente antepasado de Mercedes Pastor Moyano, la esposa de Pablo. Don Claudio Moyano fue el autor de la famosa Ley Moyano, que reguló y modificó las materias a impartir en las nuevas Facultades de Farmacia. En homenaje a Claudio Moyano, Madrid le dedicó una calle en la que se siguen vendiendo libros de segunda mano, importante referente en la historia cultural de Madrid.

Santiago fue un hito en su vida familiar y universitaria. Por los claustros de Fonseca pasaron alumnos insignes como Don José Rodríguez Carracido, Catedrático de Química de la Universidad de Madrid, y después Rector de dicha Universidad. El Doctor Antonio Casares Rodríguez, primer decano de la Facultad de Farmacia compostelana, y luego Rector de aquella Universidad, entre otros miembros gloriosos ligados a esta mítica Institución Universitaria. Pablo comenzó su andadura universitaria en una de las épocas más difíciles para la docencia y la investigación científica, pero se suplía con ilusiones y promesas, lo que normalmente deberían haber sido realidades.

Durante todos estos años, Pablo desarrolló en la Academia una importante labor científica. Pablo no era un asistente pasivo de nuestras sesiones. Como ejemplo de lo que decimos, debo destacar sus Conferencias de los jueves desde nada menos que en 1957, en la que versó sobre «La determinación polarográfica de cantidades mínimas de manganeso en presencia de otros metales». En todas sus conferencias dadas en esta casa vertía su amplia preparación básica y su propia experiencia personal. Exponía con clara sencillez, sin presunción, pero con autoridad. De todas ellas guardo un excelente recuerdo, pero quisiera destacar la auténtica lección sobre la fisicoquímica del agua formando parte de un Seminario sobre el Agua, porque gracias a ella aprendí algo de la maravilla que encierra una molécula de H₂O. Consciente de la importancia que para la salud

tienen los metales que aún en mínimas cantidades están en el aire, agua y alimentos, impartió una serie de conferencias relacionadas con esta problemática y especialmente bajo el prisma de las técnicas de análisis polarográfico y espectroscópico como las tituladas: «Determinaciones espectrofotométricas del mercurio en orina y la de otros metales biológicos», «Nuevo método polarográfico para la determinación del manganeso en los cereales cultivados en España», «Determinación del plomo y otros metales en sangre y orina por espectrofotometría». Memorable fue su lección titulada «Toxicología del óxido de carbono y la técnica de su determinación en el aire». Además intervenía a menudo en las sesiones presentadas por otros Académicos, sin humillar a quien le hubiera interpelado y participaba muy activamente en las reuniones en las que se gestionaba la administración de esta casa, dando su opinión siempre oportuna y sensata.

Pablo, también era Pedro, es decir, como el Apóstol, era piedra o de otro modo fortaleza, seguridad y firmeza que trascendía a todos y a todo. Es posible que hoy día en la que todo es acomodaticio, la firmeza de Pablo pudiera ser considerada rigidez e intolerancia, pero en lo importante hay que ser firmes para servir de apoyo a quienes somos débiles. Firmeza que no excluía la benevolencia, la tolerancia, el diálogo y la cordialidad; intolerancia, sin transigir con el error y aún menos con la mentira y con la cobardía de los tibios. No se va al desierto a ver el bamboleo de una caña movida por el viento, sino a quien dice la verdad y la mantiene; vehemente, defendiendo sus posiciones, después de larga reflexión. Cuando tomaba una decisión, era muy meditada, apoyando sus argumentos en la razón y la defendía desde el respeto hasta las últimas consecuencias; algún compañero le decía en tono cariñoso: «Pablo eres un tanque». Sabía ganar y perder, confesaba aprender más de los fracasos que de los éxitos y todo lo hacía con entusiasmo, palabra que etimológicamente significa «estar poseído por el espíritu de Dios».

Fuerte, recio como un roble o, si se quiere, como un carballo, pues en ambas regiones españolas Castilla y Galicia se formó y formó a otros. Recto, insobornable y lo era cuando fue Excmo. y Magnífico Señor Rector de la querida Universidad Compostelana o cuando impartía su magisterio en la Universidad Complutense y en la citada de Santiago de Compostela o, simplemente, como Pablo cuan-

do se reunía con sus amigos. Así fue Pablo y así lo recordamos. Aún recuerdo, con admiración, su actitud decidida y valiente en los conflictos estudiantiles, especialmente frente a la gran presión que ejercían padres y familiares de los excluidos ante la limitación del número de nuevos alumnos, que la Facultad de Medicina de Santiago quería establecer para racionalizar la enseñanza de la Medicina que, curiosamente, se resolvió con la creación de una segunda Facultad de Medicina en Santiago a unos 200 metros de la «antigua», situación que persistió unos dos cursos académicos. Una característica del modo de ser del Profesor Sanz Pedrero era su sentido de la Justicia. Es fácil ser justo cuando no se pierde nada personal en serlo; en cambio cuando se pueden perder posibilidades, cuando conlleva riesgos el ser justo es enormemente meritorio. Con justicia, actuó el Doctor Sanz Pedrero cuando, siendo profesor adjunto, se opuso a su admirado maestro el Profesor Portillo quien, lógicamente, deseaba promocionar a los alumnos internos, al apoyar para la matrícula de honor a un brillante alumno que, por cierto, es hoy un ilustre Catedrático de Universidad. Otro ejemplo, del sentido de la justicia del Profesor Sanz Pedrero; siendo Rector de la Universidad Compostelana, se recibió en el Rectorado un escrito ministerial que ordenaba vender a sus inquilinos unas viviendas para Profesores, y que en caso de no aceptar la compra, aquéllos deberían dejar las viviendas; las condiciones de la venta eran muy beneficiosas, pero Pablo consideró que la operación era lesiva para la Universidad en cuyo campus, o al menos contiguo a él, estaban las viviendas. Pablo intervino ante el Ministerio quien, lógicamente, rectificó su decisión, la cual supuso no ya sólo que el Profesor Sanz Pedrero perdiera una magnífica y baratísima vivienda, sino, lo que a mi juicio era más grave, que también la perdiera quien ahora os habla.

Pablo era un hombre especialmente sencillo, llano como su tierra castellana, de mente abierta, sabiendo siempre estar en su sitio. Su vida estuvo marcada además de por su familia por su trabajo, a los cuales dedicó su entrega y esfuerzo. Trabajador infatigable, nadie le regaló nada, todo lo consiguió por méritos propios: obsesionado por el cumplimiento del deber, disciplinado sin dejar nada a la improvisación, unido a una gran dosis de imaginación.

Investigador serio y riguroso, tenaz y constante, docente entregado. La preparación de sus clases fue tarea de una importancia capi-

tal para él a la cual dedicó gran parte de su tiempo. No es cierto que los demás profesores de la Universidad de Farmacia se hubieran quejado de tener que dar saltitos para escribir en la pizarra, puesta a la altura del Profesor Sanz Pedrero; en todo caso, la dificultad era la de poder mantenerse a su altura científica. También dedicaba una gran atención al laboratorio, a las prácticas de los alumnos que revisaba personalmente, inculcando a sus colaboradores la trascendencia de éstas en la formación integral del alumno.

Estuvo rodeado del mutuo respeto y reconocimiento de sus discípulos y colaboradores, a los que procuró ayudar y aconsejar desde su experiencia a través de su larga trayectoria universitaria; sentía un gran orgullo de sentirse superado por ellos, lo que es el distintivo del verdadero maestro. Las grandes responsabilidades que le fueron encomendadas, y que tuvo el honor y el privilegio de desempeñar, las asumió con espíritu de servicio; fue un servidor de la Universidad española y ésta se lo reconoció, otorgándole la más alta condecoración, la Gran Cruz de Alfonso X El Sabio.

El Profesor Sanz Pedrero era ávido lector de prensa, seguía con gran interés la política, aunque nunca fue político. Fue Procurador en Cortes, y como tal intervino en la transición política. En vacaciones leía libros de historia, disfrutaba con la obra de Don Antonio Cánovas, de cuya fundación fue patrono. Con Vian y Schüller fue Patrono de la Universidad Europea de Madrid, en donde organizó numerosos Cursos de Verano en Marbella.

Era muy sociable, con gran sentido del humor. Hombre de tertulias, en Santiago era asiduo de la del Aeroclub «El Senado», al que asistían profesores universitarios, médicos, farmacéuticos, y otras muchas personas representativas de la sociedad compostelana. En Madrid la del Mindanao, los primeros lunes de mes.

Con sus compañeros Luis Suárez Fernández, Rafael Álvarez-Ossorio, Alvarado, Rabade. Su peña de Río Negrito, en Hilarión Eslava, era especialmente de Notarios, Registradores y profesores universitarios.

Participó en la famosa excursión a Fuentes Carrión organizada por los Profesores Ángel Vian y Felipe Calvo, Académicos ambos de nuestra casa y la del Profesor Schüller de la de Medicina, a coger los

lirones, esas preciosas flores amarillas en forma de trompeta que hicieron famosos a los daffodils de Cambridge.

Pablo, siendo científico, era un humanista; vivió, como diría Ortega: «caminando hacia una meta». Su inquietud lo llevaba a participar en numerosas actividades culturales; era frecuente encontrarlo en muy diversos acontecimientos acompañado de Mercedes. Las vacaciones de verano las pasaba en su casa de la tierra de campos a orillas del Volpajera, donde se libró la batalla del mismo nombre entre Sancho II de Castilla y Alfonso VI de León, en la que, según la tradición, participó el Cid. Sus paseos a la puesta del sol seguía las labores del campo con interés, era hombre de campo, hijo de labrador. No era cazador, pero a veces, acompañado de algún sobrino, tiraba a las perdices y solía traer alguna de ellas a casa para dar trabajo en la cocina. Antes de terminar, no quisiera dejar de citar a las Instituciones, compañeros y discípulos más allegados que le honraron con su reconocimiento y amistad. Sus amigos eran numerosos y aunque sólo lo fueran por ser amigos de Pablo, eran ilustres.

Destacamos al eminentísimo Señor Cardenal de la Diócesis de Madrid, Doctor Don Antonio María Rouco Varela; al profesor Shüller, presidente de la Real Academia Nacional de Medicina; a Sánchez del Río, presidente de la Real Academia de Ciencias; a Fraga Iribarne, Presidente de la Comunidad gallega; Del Castillo García, Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense; a Miñones Trillo, Decano de la Facultad de Farmacia de Santiago; los jesuitas Rodríguez Izquierdo, Álvarez-Quiñones y Díaz de Rábago, y ya sin mencionar títulos que alargarían mucho esta relación, Senent Pérez, Manuel Ortega Mata, Serafín García, Cortijo Mérida, García Blanco, Varela Iglesias, Ruiz Cabello, Chantres, Begoña y Mariam Elorza, José González Jiménez, López Fonseca, Benito Regueiro, Jaime González Carreró, José Luis Vila Jato, Calleja, Concheiro, De Miguel, Recio Pascual, Ortiz Manchado, Rosa Castro, Palomares Ibáñez, y etc., etc.

Un rasgo importante de Pablo era su patriotismo, entendido éste no como patriotismo. La palabra «patria» procede de pater, es decir, del grupo familiar, ampliado. El hombre, ser social por excelencia, se constituye formando grupos que comienzan con la familia, sigue con el clan, la tribu, el pueblo, la nación, etc., que son los

vehículos para que grupos de hombres sirvan a la Humanidad. **La patria es después de la familia, una de las instituciones primarias de la vida humana. Es la humanidad próxima a la que debemos lealtad.** La Patria como concepto, como constructo, podrá tener unos descriptores geográficos, paisajísticos, étnicos, culturales, lingüísticos, religiosos y sobre todo históricos, y se constituye en nación, es decir, en entidad, en la cual se pueda ejercer la actividad personal, laboral, social y política, como nos enseñaron básicamente Kant y Sieyes desarrolló la Ilustración y adoptó la Revolución Francesa, madurando en el siglo XIX, cuando la meta son valores universales, en lugar de los étnicos o locales que se incorporan a las Constituciones (Stemberger, 1979), hecho que considero positivo si para mantenerlos se respetan los principios éticos y morales. En cambio, el patriotismo definido como el amor por el propio país, simplemente porque es el nuestro, no es una virtud. Un uso espúreo de la Patria es su utilización como mecanismo compensador de nuestra personalidad, cuyas propiedades las hacemos nuestras; si nuestra Patria (o equipo de fútbol o lo que sea), es grande, yo también lo soy. La máxima patrioterica inglesa que he visto esgrimida por pueblos de habla no inglesa, concretamente en Angola, «my country right or wrong», siempre me ha parecido una monstruosidad; la verdad debe prevalecer siempre, y si mi patria no defiende la verdad, la justicia y la paz, no debe ser mi patria o, en todo caso, sería una patria deforme y morbígena. El amor a la Patria no debe basarse en el orgullo «porque es la mía». De este modo, la Patria sería la representación del egoísmo, de la cerrilidad, de la arrogancia, de la indiferencia o del desprecio hacia los otros. Pablo Sanz concebía a la Patria, a España, como el ámbito en el que servir a los demás y por ello Pablo sentía el orgullo de ser español.

El ser social, el animal social que decía Aristóteles, no se puede concebir aislado como si se tratara de una pieza de anatomía. Su familia fue todo para él, a sus padres siempre les recordó con respeto, agradecimiento y cariño. Pablo formó una familia; compartió con su esposa Mercedes, su compañera durante 49 años de matrimonio, sacrificios, proyectos, ilusiones y desilusiones; su vida entera. No tuvieron hijos, pero Dios les ha proporcionado queridos sobrinos cuyo cariño, filial, los han reemplazado sobradamente. La auténtica paternidad no son los hijos biológicos, que tiene su fundamento en

una determinada secuencia de bases nitrogenadas, sino el afecto paternal que se derrama sobre otros, en este caso sobre sus sobrinos. No se concibe a Pablo Sanz sin Mercedes Pastor, de quien Pablo, lo sé, se sentía protector y al mismo tiempo admirador orgulloso y enamorado. La fortaleza psíquica de Pablo no era completa sin el contrapeso de su mujer, sensible y culta sin pedantería. Pero mejor que yo, lo dijo aquí, en este mismo salón, el propio Pablo, quien en su abundancia *cordis* rompió la solemnidad de lo académico para decirnos: «Mi incomparable agradecimiento a mi más directa y permanente ayuda y aliento, a mi esposa Mercedes, que en todo momento ha sabido, no sólo aceptar generosamente el sacrificio de gran parte de nuestra vida familiar, sino también aconsejar e inspirar ánimos de superación frente a cualquier momento de desfallecimiento. A Dios nunca agradeceré lo suficiente el don de su presencia a mi lado y a que mi vida, siempre con ella, se vea enriquecida, van dirigidas mis plegarias de cada día». El cónyuge de una persona no es la media naranja. La unidad de un casado es el matrimonio y el tratar a uno de los miembros del mismo aisladamente es amputar a los dos. El «hasta que la muerte os separe» me parece un error; sabemos que después de la muerte no hay sexualidad, pues ya no se necesita la reproducción, pero la muerte no corta la trascendental unión que supone el matrimonio. Pablo y Mercedes, Mercedes y Pablo constituían y siguen constituyendo una hermosa unidad. El animal enfermo que es el hombre padece a lo largo de su vida muchas enfermedades, pero hay una, la definitiva, aquélla que nos va a quitar la vida y que va a estar presente en nuestra muerte y que por ello va a ser nuestra enfermedad, a la que por eso debemos respetar y hasta amar. Recordemos el místico «Ven muerte tan escondida, que no te sienta conmigo...». La destrucción neuronal, la de la sinapsis, que aparecen en el Alzheimer, va rompiendo las conexiones de los enfermos con el perimundo, con los demás, lo que tanta tragedia supone para los familiares de los enfermos, pero no sabemos, no podemos saber porque no se deben a los circuitos nerviosos, las relaciones que determinan nuestro yo; estoy seguro que Pablo, como los demás enfermos, habrá mantenido largos, íntimos y enriquecedores coloquios consigo mismo. Por último, cristiano y católico practicante; ya habrá comprobado lo que San Pedro nos dejó escrito en su primera Carta: «Bendito sea Dios, Padre de Nuestro Señor Jesucristo, que en su gran misericordia, por la resurrección de

Jesucristo de entre los muertos, nos ha hecho nacer de nuevo para una esperanza viva, para una herencia incorruptible, pura, imperecedera, que os está reservada en el cielo».

Estamos recordando al Profesor Sanz Pedrero. Recordar es pasar de nuevo por el corazón. Por eso, al final de mi intervención, he vuelto a rebobinar la figura de Pablo Sanz, nuestras conversaciones en las reuniones con nuestras Mercedes. Creemos con Julián Marías, que el nacimiento de un ser humano es una innovación radical de la realidad, una creación, es decir, la aparición de una realidad nueva e irreductible, lo que hace impensable ni imaginable que con la muerte sobrevenga la aniquilación, la eliminación de la persona, sobre todo cuando muere alguien a quien, como Pablo, queremos.

En este recuerdo de una vida intensa, comprometida, siempre viviéndola, asumo la pena sentida por los que día a día, a lo largo de toda la fecunda trayectoria académica y personal del Profesor Sanz Pedrero y que han sabido compartir sus ilusiones e inquietudes científicas, con el afán de una constante superación en la apasionada dedicación a la investigación y la docencia en las Cátedras Físico-Química de las Universidades de Santiago y Complutense, a sus numerosos discípulos, muchos de ellos eminentes profesores y, desde luego, a la persona con la que compartió la vida, la salud y la enfermedad, las ilusiones y los desfallecimientos, es decir, a Mercedes Pastor Moyano, a la Excma. Señora de Sanz Pedrero a quien en nombre propio y en el de todos los Académicos deseo expresar nuestro respeto y pesar. Descanse en paz.

Carta a Don Pablo

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excma. Señora Doña Mercedes Pardo Moyano, viuda de Don Pablo Sanz Pedrero; Excmo. Señor Presidente, Excmas. Señoras y Señores Académicos, Señoras y Señores.

Muchas gracias, Señor Presidente, por permitirme testimoniar mi afecto al Profesor Sanz Pedrero.

Como el tiempo es escaso, para utilizarlo de modo preciso, he pensado en una breve carta:

Querido Don Pablo:

Tengo curiosidad por saber si en los laboratorios del paraíso se gastan novatadas a los recién llegados, y usted enseguida comprenderá la razón.

Seguramente recuerda usted nuestra querida y añorada Facultad de Fonseca en Santiago de Compostela. Era en octubre de 1965 cuando comenzaba el curso selectivo, la primera vez que se impartía en la Facultad de Farmacia. Yo tenía por aquel entonces diecisiete años. En el primer cuatrimestre, Don Jaime González Carreró impartía la química, Don Luis Alias Josafat, la geología, y Don Pablo Sanz Pedrero, de imponente presencia y voz sonora, la física. El aula de la planta baja, dispuesta como los anfiteatros romanos, sólo que de madera vieja, crujía a cada movimiento, cosa que molestaba a Don Pablo, con lo que hasta los apuntes se tomaban con delicadeza para no arriesgarse...

Era la época de los alumnos internos y pasé con éxito un examen para ser admitida como tal en la cátedra de química inorgánica. Una vez en el laboratorio, los jóvenes investigadores, Florencio y Pacolas, que realizaban la tesis doctoral con don Jaime, se quedaron, según ellos, escasos del óxido de deuterio, D_2O , también conocida vulgarmente como agua pesada. Como estaban muy ocupados, me pidieron que, por favor, me acercara a la Cátedra de Física, que estaba en la misma planta, a pedir un litro del susodicho líquido, dándome a tal efecto un vaso de precipitados. Alegre y confiada, y además deseando ser útil en tan noble tarea, me acerqué a la Cátedra de Física, Fisico-química y Técnicas Instrumentales a realizar el encargo. Me recibió otro joven, el Profesor Miñones, quien muy amablemente me dijo que él me la daría encantado, pero que por respeto y buen proceder debería de solicitarla al nuevo catedrático, Don Pablo, que había llegado de Madrid. Me introdujo muy cortésmente en el despacho de Don Pablo, donde sin ningún asomo de duda, con absoluto desparpajo y naturalidad procedí a solicitar el óxido de deuterio. Don Pablo pasó de la sonrisa amable del recibimiento al más absoluto de los enfados, diciéndome, entre otras cosas: que los estudiantes de hoy día ya no eran como los de antes, que no teníamos nivel para estar en una facultad y que había una falta de respeto total al trabajo del profesor (recuerden que esto ocurría en el año 1965 y algunos profesores siguen diciendo lo mismo hoy día). Pero sigamos, yo no entendía nada, traté de mantener mi dignidad, aunque bien podía haber llenado el vaso de lágrimas, el de precipitados, de lo mal que me encontraba. Entre la cara de asombro que debí de poner y la media sonrisa del Profesor Miñones, Don Pablo cayó en la cuenta del pardillo/o pardilla que le habían enviado, la novatada había sido doble y él la segunda víctima. Me dijo: vállase, vállase, y una vez entornada la puerta del despacho, escuche al otro lado la más sonora de las carcajadas, sin lugar a dudas de Don Pablo. Luego, cuando me encontraba en clase o en prácticas me preguntaba si ya tenían agua pesada los de química.

Por vergüenza me documenté *a posteriori* de todo lo referente al agua pesada y comprendí que una cosa eran los libros, en donde todo existía y era accesible, casi como en sueños, y otra la realidad de lo disponible, y que por agua enriquecida en deuterio se habían invadido países en la segunda guerra mundial.

Siete años más tarde, en 1972, realizando mi tesis doctoral en Estrasburgo, volví a encontrarme con el óxido de deuterio, esta vez para identificar la presencia de una histidina reactiva en el centro catalítico del enzima de síntesis del neurotransmisor Noradrenalina, la Dopamina-beta-hidroxilasa, pues las cinéticas de ionización se desplazaban en 0.5 unidades de pH al ser realizadas en agua pesada. Hice un brindis por don Pablo, pues no se me hubiera ocurrido hacer el experimento sin el bagaje previo.

Treinta años más tarde, en 1995, tuve el privilegio de coincidir con Don Pablo en esta Real Academia y le recordé la anécdota con regañina incluida, lo que le hizo mucha gracia, pues él también se acordaba. Esto generó un gran afecto y aprecio mutuo, que ha sido, por mi parte, sentido como un gran privilegio.

Seguramente, ya habrá pasado con nota su examen de novato en los laboratorios y reboticas del paraíso, y estas escasas líneas son el modo de testimoniarme mi recuerdo y gratitud por su Magisterio.

Gracias, Don Pablo.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesión Inaugural del Curso Académico 2005

Orden del día

1. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2004 por la Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé.
2. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez, Académico de Número, titulado «Avances en Geobotánica».
3. Entrega de dos Medallas Carracido, categoría Oro, a los Excmos. Señores Don Ángel Santos Ruiz y Don Eduardo Rodríguez Rovira, y una Medalla Carracido, categoría Plata a Don Nicolás Forteza Forteza.
4. Toma de Posesión de Académicos Correspondientes.
5. Reparto de Premios del Concurso Científico de 2004.
6. Clausura del Acto.

Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2005



Mesa de la Presidencia (de izda. a dcha.): Don Ángel Santos Ruiz, Don Juan Manuel Reol Tejada, Doña M.^a Jesús Sansegundo Gómez, Don Salustiano del Campo Urbano y Don Amador Schüller Pérez.

El día 20 de febrero de 2005, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico. El acto revisió gran solemnidad. Presidió la Ministra de Educación y Ciencia, M.^a Jesús San Segundo, junto a ella el Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Juan Manuel Reol Tejada; el Presidente del Instituto de España, Salustiano del Campo; el Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Amador Schüller, y nuestro Presidente de Honor, Don Ángel Santos Ruiz. De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF hizo la salutación primera. La Profesora Francés Causapé, Académica Secretaria, leyó la Memo-

ria de Actividades Académicas correspondientes al año 2004; a continuación el Profesor Rivas Martínez leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre «Avances en Geobotánica», poniendo de manifiesto que su contribución a esta ciencia le sitúa entre los primerísimos botánicos del mundo. Posteriormente la Ministra entregó las Medallas Carracido de Oro al Profesor Santos Ruiz, igualmente la Medalla de Oro a Eduardo Rodríguez Rovira y de Plata a Nicolás Forteza. Los distinguidos tuvieron palabras de gratitud para la Academia y subrayaron el honor que para ellos significaba recibir la Medalla Carracido.

Por último, la Ministra entregó también, los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Alcalíber, Premio Cinfa, Premio Mabo, Premio Normon, Premio Juan Abelló, Premio Carlos del Castillo Leiva y Premio Santos Ruiz, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores.

El acto contó con una masiva asistencia y la presencia del Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, Don Miquel Yllá; la Jefe del Gabinete de la Ministra de Educación, Doña M.^a Jesús Serviá Reymundo; el Director General de Farmacia de la Comunidad de Madrid, Don Javier Hernández Pascual; la Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, María del Val Díez Rodrigálvarez, y el Vicepresidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Don Manuel Fuentes entre otras personalidades.

Por su interés, y porque aclara el sentido del acto, transcribimos íntegras las palabras de nuestro Presidente el Doctor Juan Manuel Reol Tejada:

«Antes de cualquier otra cosa, permitidme que haga una referencia al año 2004. Porque los Académicos no viven en una urna de cristal, ni de espaldas al mundo, sea nuestro primer recuerdo para los 192 muertos, víctimas del atentado terrorista del 11-M en Madrid. Las víctimas son siempre inocentes por eso, como dice Ulri-Beck: “ningún Dios, ninguna idea y ninguna causa justifica el terrorismo”.

Si su recuerdo es lacerante también, sin embargo, nos estimula para no olvidar nunca su muerte y poner los medios para que tal tragedia jamás vuelva a ocurrir.

Año dramático, también, para la Academia. Cinco de los nuestros nos han dejado, sus nombres están en nuestro corazón y constan en la memoria que ahora leerá la Secretaria. Yo quiero decir que su recuerdo estará siempre vivo en nosotros porque no dejaremos que se disipe, “allá, allá donde habita el olvido”.

Año dramático para el sudeste asiático. Hoy nos dicen que los muertos se acercan a 200.000. Si una vida tiene valor infinito estaríamos ante 200.000 infinitos. Pero estamos ante la muerte individual y única de personas con su historia, su familia, sus proyectos y sus esperanzas. El dolor estimula nuestra solidaridad y se traduce materialmente en la ayuda de España y de millones de españoles.

Ahora empezamos el 2005, que se abre con la magnífica esperanza de la Constitución europea, un paso trascendente en la construcción de Europa. Una Europa que cierra sus heridas, una Europa que es un espacio para la educación, que es tanto como decir para la paz y un espacio para la investigación científica. Proyecto este que ha dirigido nuestro compañero el Profesor Mayor Zaragoza, nombrado por todos los Ministros de Ciencia de la Unión Europea, Coordinador General del trabajo que culmina en una Política Común para la Ciencia y la Investigación Europea.

Señora Ministra: es un grandísimo honor para esta Academia su presencia en este acto. Ya conocíamos su sensibilidad y consideración hacia el Instituto de España y las Reales Academias a través de nuestras conversaciones con el Secretario de Estado, interlocutor de su Ministerio con nosotros. El Profesor Salvador Ordóñez se ha acercado a las Academias para estimular nuestro trabajo y lo ha hecho de manera abierta, cordial e inteligente.

Deseo, señora Ministra, expresarle sinceramente nuestro compromiso de leal colaboración, ofrecerle nuestra página Web (con seis mil visitas diarias) y nuestra tribuna pública para juntos hablar de I+D, del espacio europeo de educación y de tantas otras cosas que interesan a la comunidad universitarias, sanitaria, científica y en definitiva a la sociedad civil.

Señora Ministra, las Academias son corporaciones de derecho público independientes, que cuenta con el Alto Patronazgo constitucional de S. M. El Rey, y que se insertan en el Estado con un valor propio. Las Academias reflexionan, debaten y promueven la ciencia y contribuyen a su difusión. Pero hacen más, se ponen al servicio de los poderes públicos cuando estos requieren su consejo. Por sí mismas sugieren o advierten sobre hechos o doctrinas. Las Academias deben, incluso, anticipar escenarios para que los poderes puedan tomar las decisiones más adecuadas.

Pero esas palabras no son retóricas, cobran realidad tangible cuando repasamos que el año 2004 la Academia, sola o en colaboración, ha editado textos extraordinariamente significativos como expresan sus títulos: “Nuevos avances en medicamentos”, “Tratamiento y cuidados del enfermo de Alzheimer”, “La investigación y el Instituto de Salud Carlos III”, “Nuevas oportunidades y tecnologías en el descubrimiento de fármacos y medicamentos”, “El citocromo P.450”, o “La gripe aviar”.

Unos con el apoyo de nuestra Fundación de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Otros con el Instituto de España, por eso quiero agradecer a su Presidente, Salustiano del Campo, su receptividad a las iniciativas de nuestra representante en él, la Doctora Cascales, que deja por voluntad propia su cargo tras seis años de brillantes resultados en magníficas publicaciones interacadémicas.

Por último, en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina —con quien hemos realizado dos sesiones conjuntas, lo que marca un hito en la historia académica—, sobre cuestiones tan importantes y actuales como la gripe aviar o algunos aspectos de neurociencias. Quiero agradecer, muy de verdad, la abierta actitud y el impulso a estas relaciones del Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Profesor Amador Schüller, que nos honra con su presencia, y de su Secretario General, Profesor Jiménez Collado.

Señora Ministra, Señoras y Señores Académicos, no quiero olvidar en este acto de una Academia tan ligada a las ciencias de la vida y la salud como la nuestra, un recuerdo al mundo de la Sanidad y a sus gestores y profesionales sanitarios. El Sistema Nacional de Salud, que se basa en principios que compartimos plenamente —la equidad, que lleva a la universalidad y la solidaridad, que lleva a la finan-

ciación pública vía presupuestos—, es una construcción política constitucional en cuya defensa y mejora estamos comprometidos.

Señora Ministra: A continuación, después de la Memoria de 2004, escuchará la lección magistral con la que se inaugura el curso que dictará el Profesor Rivas, una primera figura de la Botánica mundial, luego entregará la Medalla Carracido a tres singularísimas personalidades:

- El Profesor Don Ángel Santos Ruiz, introductor de la Bioquímica en los estudios de licenciatura de la Universidad Española, maestro de maestros, sus discípulos ocupan cátedras en muchas Facultades de Farmacia, Biología, Medicina o Veterinaria. Impulsor del renacer de esta Academia en tiempos difíciles, es nuestro Presidente de Honor y le tenemos todas las semanas entre nosotros en las sesiones científicas, interviniendo, con la lucidez que da la experiencia y la sabiduría de sus noventa y dos años. Su vida ha sido la defensa de la dignidad humana desde sólidos principios, el trabajo y el señorío en el trato.
- Eduardo Rodríguez Rovira, gran ejecutivo de una multinacional farmacéutica, que ha dado ejemplo de convergencia con los intereses del país al ubicar aquí sus centros I+D y de producción. Se debe en gran parte a él que el balance social de ese laboratorio sea positivo. Pero Eduardo Rodríguez Rovira sacó tiempo para ayudarnos los primeros años a poner en pie el proyecto de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Durante ocho años ha sido Vicepresidente Ejecutivo de la misma y a ella ha dado su trabajo, su imaginación y su apoyo en todos los órdenes. La Academia agradece sinceramente su ayuda.
- Nicolás Forteza, farmacéutico ejemplar primero, comprometido con el paciente y la salud pública, fue luego “secuestrado” en exclusiva por el arte. Nicolás Forteza es uno de nuestros primeros paisajistas españoles. Pintor de renombre internacional, expone sus óleos en las principales galerías del mundo. Los expertos dicen que nadie como él lleva al lienzo los azules, los blancos y los verdes de su Mallorca natal. En la Academia hay pruebas de su talento artístico. La Academia,

al premiarle, quiere poner de manifiesto que no es ajena, muy al contrario, a esa dimensión artística tan consustancial con los profesionales sanitarios, con ese perfil humanístico tan propio de la Farmacia.

Señora Ministra: Voy a terminar. Hemos cerrado el año 2004 eligiendo Académico de Honor al Profesor Massagué, Doctor en Farmacia, que en Nueva York dirige el laboratorio de oncología del Sloan Kettering Center y sus hallazgos constituyen esperanza fundada de un próximo Premio Nobel para él, que ya es Premio Príncipe de Asturias 2004. El próximo jueves, otro Premio Príncipe de Asturias, Manuel Losada, Doctor en Farmacia, dictará la lección de la primera Sesión Científica del año. Eso quiere decir que la Academia no olvida a las grandes figuras científicas, muy al contrario, sus éxitos nos honran.

Al filo de 2005 la Academia cultiva las ciencias farmacéuticas y afines, se abre al mundo desde la red y cuando algunos pretenden fragmentar el territorio y recortar los horizontes, desde las Academias contribuimos todos los días a construir lo que Adela Cortina llama la “Ciudadanía cosmopolita”».

Concurso Científico Relación de Premiados 2004

PREMIO DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

María Morante Hernández, Luis Torres Asensi y M.^a Teresa Barber Sanchís.

Por su trabajo titulado: *«Estudio del estrés oxidativo hepático en un modelo in vivo de deficiencia en vitamina E».*

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS

M.^a Francisca Molina-Jiménez, M.^a Isabel Sánchez Reus y Juana Benedí Gonzalez.

Por su trabajo titulado: *«Efecto protector de fraxetol y miricetina frente a la neurotoxicidad inducida por rotenona en células de neuroblastoma».*

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

Mónica Arribas García, Ángela Martínez Valverde y Manuel Benito de las Heras.

Por su trabajo titulado: *«Papel de las proteínas IRS-1 en la acción y resistencia a la insulina en los adipocitos marrones».*

PREMIO ALCALÍBER

M.^a José Gómez-Lechón Moliner y M.^a Teresa Donato Martín.

Por su trabajo titulado: *«Detección de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en hepatocitos cultivados durante el desarrollo preclínico de fármacos».*

PREMIO CINFA

M.^a Teresa Larrea Marín, M.^a Isabel Sevillano Navarro, Sofía Ródenas de la Rocha y Francisco José Sánchez Muñiz.

Por su trabajo titulado: *«Determinación de elementos traza en cabello mediante espectrometrías ICP. Aplicación a una población con dieta ovolactovegetariana».*

PREMIO FAES PHARMA, S. A.

Desierto.

PREMIO MABO

Abel Martín Garrido, Mercedes Griera Merino, Gema Pérez Rivero, M.^a del Carmen Boyano Adanes, M.^a Piedad Ruiz Torres y Manuel Rodríguez Puyol.

Por su trabajo titulado: *«Importancia de la disfunción endotelial en la patología vascular».*

PREMIO NORMON

Mirian Zeini Moreno y Sonsoles Hortelano Blanco.

Por su trabajo titulado: *«Papel del óxido nítrico en el balance proliferación/apoptosis en regeneración hepática y hepatotoxicidad».*

PREMIO JUAN ABELLÓ

Amalia Fernández Martínez y Paloma Martín Sanz.

Por su trabajo titulado: *«Papel de ciclooxigenasa-2 y metaloproteasas de matriz extracelular en la patología hepática crónica causada por el virus de la hepatitis C».*

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA

Ana Isabel Olives Barba, Emiliano Ezequiel Romero Ale y M.^a Antonia Martín Carmona.

Por su trabajo titulado: *«Influencia de las ciclodextrinas sobre la reactividad y las propiedades espectroscópicas de los reactivos fluorogénicos derivados de carbazol. Proyección en la determinación de aminas de interés farmacológico».*

PREMIO SANTOS RUIZ

Manuela Merino Arévalo.

Por su trabajo titulado: *«Influencia de ciclodextrinas y tensoactivos en la disolución de fármacos antiinflamatorios no esteroideos».*

Concurso Científico 2005

La Real Academia Nacional de Farmacia (España) convoca el Concurso Científico del año 2005, de acuerdo con las siguientes Bases Generales.

BASES GENERALES

- I. Características de los trabajos presentados a los diferentes premios.
- II. Preparación de manuscritos.
- III. Relación de Premios.
- IV. Recepción de trabajos.

I. Características de los trabajos

1. Podrán optar al Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia trabajos originales de investigación en ciencias farmacéuticas.
2. Podrán optar a otros premios del Concurso Científico trabajos de revisión o investigación sobre ciencias farmacéuticas y afines.
3. Los trabajos se adecuarán al tema específico de cada premio, o en el caso de tema libre, a cualquiera de los incluidos en los objetivos generales de la seis secciones de la Academia (véase anuario o <http://www.raf.es>).
4. Los trabajos deben ser **inéditos**, escritos indistintamente en español o inglés y redactados específicamente para el concurso de acuerdo con las normas de presentación especificadas. No serán objeto de evaluación los trabajos que a juicio de la Academia incumplan esta norma.
5. Los premios se otorgarán a los trabajos, sean éstos unipersonales o colectivos, y el fallo de los jurados será inapelable.

6. Ningún autor que haya recibido el Premio de la Real Academia en una determinada convocatoria podrá aspirar al mismo en la siguiente convocatoria. El incumplimiento de la norma citada anulará el premio concedido.
7. Los trabajos premiados pasan a ser propiedad de la Academia. Una vez publicados, los datos originales sólo podrán figurar en otra publicación con el permiso expreso de la Academia.
8. Los Académicos de Número no podrán figurar como autores de los trabajos presentados a este Concurso Científico.
9. En cada concurso, a propuesta del Jurado, los diferentes premios, pueden ser otorgados a un solo trabajo, desglosados en Premio específico y Accésit o declarados desiertos.

II. Preparación y presentación de manuscritos

1. Los trabajos presentados a los diferentes premios del Concurso Científico especificarán en su primera página el **premio al que aspiran** y el **lema de una sola palabra** con que se identifican. El título del trabajo y demás capítulos que lo componen se escribirán en la segunda página y sucesivas.
2. Estarán escritos en Word, en un mínimo de 10 y un máximo de 60 folios A4 numerados por una sola cara, a un espacio y medio, con tipo (fuente) «Times New Roman», 12, y los siguientes márgenes: superior, 6 cm; izquierdo, 4,2 cm; derecho, 4,2 cm; inferior 5,2 cm. Los cuadros, tablas y figuras y sus pies pueden estar incluidos en el texto.
3. Serán remitidos en dos ejemplares cosidos en formato papel y un disquete o CD rotulado con el lema y premio al que aspiran, escrito también en Word o transcrito a PDF.
4. En los trabajos experimentales se recomienda la presentación del siguiente modo:
 - a) Un título conciso, breve y significativo, en español e inglés.

- b) Un resumen o summary de alrededor de 200 palabras y su traducción.
- c) Una introducción breve y documentada que sitúe el trabajo en el contexto científico al que pertenece, con referencia explícita de los trabajos propios o ajenos en los que se apoya. La introducción delimitará con claridad la hipótesis desarrollada o los fines y objetivos que se persiguen.
- d) La exposición de los materiales y métodos empleados, así como las experiencias realizadas. La descripción de las experiencias no contendrá más datos que los necesarios para su reproducibilidad.
- e) Los resultados y su discusión crítica y comparada, así como las conclusiones que se puedan apoyar en los resultados obtenidos.
- f) La bibliografía que se cita.

Se recomienda que en lo referente a los símbolos, formato de bibliografía, tablas y figuras, caracteres de imprenta y demás aspectos de presentación de los manuscritos, se sigan las normas para la presentación de originales especificados en los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia [Vol. LXX (1): 271-274] o en la WEB de la academia arriba indicada.

El resto de los trabajos de investigación o revisiones pueden adoptar, después del título y resumen, un formato libre, con los márgenes de extensión antes indicados.

En ningún caso se identificará implícita o explícitamente el autor o autores del trabajo. Se procurará evitar autocitas en el texto. Las citas propias se harán tan anónimas como el resto de las indicadas en apoyo de la introducción, métodos y discusión del trabajo.

5. Cada original irá acompañado de un condensado del trabajo, de unas 1.000 palabras de extensión, identificado con el correspondiente lema, redactado en el mismo idioma en que se presenta el trabajo.

6. En sobre cerrado aparte, identificado con el mismo lema y premio al que aspira el trabajo, se incluirá una ficha con el nombre habitual de firma del autor o autores del trabajo, junto con su dirección postal, correo-e, centro de trabajo y teléfonos de localización.
7. Los envíos de originales se realizarán por correo certificado o mediante entrega personal, dirigidos al Presidente de la RANF, Concurso Científico, c/ Farmacia, 11, 28004 Madrid.
8. Los originales no premiados podrán retirarse, una vez publicado el fallo del concurso, antes del 31 de marzo del año siguiente, en que serán destruidos.

III. Relación de premios

PREMIO REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Seis mil euros.

TEMA: Libre, inédito y de investigación.

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO ALCALIBER

Tres mil euros.

TEMA: Cultivo de *Papaver somniferum* y nuevas aplicaciones terapéuticas.

PREMIO CINFA

Tres mil euros.

TEMA: Farmacología, farmacoterapia y seguimiento fármaco-terapéutico.

PREMIO FAES FARMA

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO MABO

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO NORMON

Tres mil euros.

TEMA: Nuevas tecnologías aplicadas a los medicamentos.

PREMIO JUAN ABELLÓ

Tres mil euros.

TEMA: Libre.

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA

Seiscientos euros.

TEMA: Libre, sobre técnicas instrumentales en Farmacia.

PREMIO SANTOS RUIZ

No sometido a las bases del concurso. Abono de los derechos de expedición del título de doctor, a un doctorando que trabaje en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Los interesados presentarán un ejemplar de la tesis y su expediente académico, dentro del plazo del concurso.

IV. Recepción de los trabajos

Hasta el jueves **27 de octubre de 2005** a las **21 horas**.

Sesiones Científicas

13 de enero

A las 19,00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Doctor Don José Pío Beltrán, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, quien pronunció su discurso titulado: «La Ingeniería Genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humana». Presentado por la Excm. Señora Doña Ana María Pascual-Leone Pascual.

20 de enero

A las 18,00 horas, Solemne funeral en la Iglesia Parroquial de San Ildefonso por los Académicos fallecidos.

A las 19,00 horas, Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico. Pronunció el Discurso el Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez, titulado «Avances en Geobotánica».

Toma de Posesión como Académicos Correspondientes.

Entrega de Medallas Carracido en su categoría Oro a los Excmos. Señores Don Ángel Santos Ruiz y Don Eduardo Rodríguez Rovira, y de una Medalla Carracido en su categoría de Plata a Don Nicolás Forteza Forteza.

27 de enero

Nuestro Presidente, Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, ha sido ratificado en su cargo de Consejero en la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (*BOE*, 27 de enero de 2005).

A las 19,00 horas, Conferencia del Excmo. Señor Don Manuel Losada Villasante, Académico de Honor, titulada «Del corazón y la mente».

3 de febrero

A las 19,00 horas, Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero. Coordinador: Excmo. Señor Don

Manuel Ortega Mata. Ponentes: Excmo. Señor Don Vicente Vilas Sánchez: «Pablo Sanz, mi Profesor»; Excmo. Señor Don José Miñones Trillo: «Figura de Pablo Sanz en la Universidad de Santiago de Compostela», y Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona: «Pablo Sanz, Académico y Compañero».

10 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia por el Doctor Don Cosme de los Santos Carballido, Académico Correspondiente y Delegado en Uruguay, titulada: «Avances biofarmacéuticos en corticoterapia tópica en enfermedades inflamatorias crónicas en la piel».

17 de febrero

A las 18,00 horas, Conferencia por el Doctor Michael R. Cohen, Presidente del Institute for Safe Medication Practices, titulada: «Improving Medication Safety».

A las 19,00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Doctor Bart Rombaut, Profesor del Departamento de Microbiología e Higiene en la Vrije Universiteit Brussel de Bélgica, quien pronunciará su discurso titulado: «History and Future of proliovaccination, a personal account». Presentado por el Excmo. Señor Don Benito del Castillo García.

24 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia por la Doctora Concepción García Mendoza, Académica Correspondiente, titulada: «El microparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o “mole seca” del champiñón».

3 de marzo

A las 19,00 horas, Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo. Coordinadora: Excmo. Señora

Doña M.^a del Carmen Avendaño López. Ponentes: Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López: «Gregorio González Trigo: El amigo y el docente»; Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Avendaño López: «Gregorio González Trigo: Esfuerzo, constancia y talento», y Profesor Doctor Don Julio Álvarez Builla: «Gregorio González Trigo: Una visión en el tiempo».

10 de marzo

A las 19,00 horas, Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Señor Don León Villanúa Fungairiño. Ponentes: Excmo. Señor Don Bernabé Sanz Pérez: «El Doctor Villanúa, como docente, investigador y académico»; Doctora Doña Carmen de la Rosa Jorge: «Investigador y divulgador de nuestras aguas mineromedicinales», y Doctora Doña Esperanza Torija Isasa: «Su perfil humano».

17 de marzo

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre el tema: «El agua: De la esencialidad al riesgo». Intervienen como ponentes los Excmos. Sres.: Don Albino García Sacristán: «El agua en los seres vivos»; Don Manuel Domínguez Carmona: «El agua, vehículo de contaminación bacteriana y vírica», y Don Segundo Jiménez Gómez † y la Doctora M.^a del Carmen Cartagena Causapé: «Potabilidad y desinfección de las aguas».

31 de marzo

A las 19,00 horas, Mesa Redonda sobre el Balneario Cervantes. Ponentes: Excmo. Señor Don León Villanúa Fungairiño † y Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé: «El Balneario de Cervantes. Historia y generalidades»; Doctor Don Miguel Ladero Álvarez: «Estudio de la vegetación del entorno de las aguas del Balneario de Cervantes»; Doctora Doña Ángeles Mosso Romeo y Doctora Doña Carmen de la Rosa Jorge: «Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Cervantes».

Noticias

El 22 de febrero, en el Palacio de La Zarzuela, fue recibido en Audiencia Real el Pleno de nuestra Corporación, para hacer entrega a S. M. el Rey Don Juan Carlos I, de la Medalla de Oro Carracido, en edición especial, máxima distinción de la Real Academia Nacional de Farmacia.



Su majestad departió amablemente con los Señores Académicos y elogió la labor de la Real Academia Nacional de Farmacia. El Señor Presidente agradeció el gesto de su Majestad con estas palabras:

«Señor:

Palabras de gratitud. En primer lugar, por haber aceptado esta máxima distinción de nuestra Academia, la Medalla Carracido, que en

esta ocasión tiene carácter exclusivo y único. Esta Academia se honra al entregársela oficialmente en esta audiencia privada.

Gracias, también, por vuestra ayuda y por vuestro afecto. Gracias por haber subrayado públicamente que nuestro más preclaro antecedente es la Real Cédula de su antecesor el Rey Felipe V que, con significativos rasgos académicos, otorgó los Estatutos fundacionales al Real Colegio de Profesores Boticarios de Madrid en pleno "Siglo de las luces".

Palabras de trabajo y compromiso en segundo lugar. El artículo 62 de la Constitución señala como una atribución de la Corona, "el Alto Patronazgo de las Reales Academias". Señor, este precepto constitucional nos obliga a un máximo esfuerzo de trabajo y modernización. Por ello nuestra Academia tiene en marcha, con espléndidos resultados, un programa que abarca desde la restauración de la Sede al empleo de las nuevas tecnologías (estamos en la Red con seis mil visitas diarias); desde los convenios con instituciones académicas y científicas a la edición (en exclusiva o en colaboración con el Instituto de España o la Real Academia Nacional de Medicina) de ocho publicaciones el año 2004, que abarcan desde avances en nuevos medicamentos, enfermedades neurodegenerativas o el tratamiento y cuidado de los enfermos de Alzheimer, entre otros temas.

La Real Academia Nacional de Farmacia, en definitiva, mantiene día a día su esfuerzo por reflexionar, debatir y hacer propuestas anticipatorias sobre las grandes cuestiones de las ciencias de la vida y la salud y las específicas Ciencias Farmacéuticas. Sin olvidar el compromiso social al que nos debemos cuando tratamos aspectos que ponen de manifiesto el derecho a la protección de la salud, el papel del Estado, la solidaridad internacional y las fronteras de la ética.

Palabras de solidaridad, por último, con las restantes Reales Academias del Instituto de España con las que nos unen similares afanes y el sentirnos unidas bajo el Patronazgo de la Corona. La Real Academia Nacional de Farmacia desearía que éste se hiciera patente, también, mediante algún vínculo que expresara más directamente nuestra unidad y ese Alto Patronazgo.

Compromiso con la Constitución que garantiza la unidad, la libertad, la soberanía y la solidaridad de todos los españoles y que hace de

la Corona el vértice último de esa grandiosa construcción política. Solidaridad con las comunidades científica y sanitaria y, en definitiva, con la sociedad civil a quien nos debemos.

Señor:

He querido ante Vos subrayar nuestro esfuerzo para cumplir con nuestras obligaciones públicas. Quiero, especialmente y en nombre de todos los Académicos de esta Real Academia Nacional de Farmacia, agradecerle esta audiencia y expresarle nuestro respetuoso reconocimiento por su extraordinaria dedicación al servicio de España».

* * *

Noticias (*continuación*)

El 1 de enero de 2005, la Doctora Miras Portugal ha sido nombrada miembro del Comité de Publicaciones de FEBS (Federación Europea de Sociedades de Bioquímica).

* * *

El día 17 de enero de 2005 se entregó la Medalla Balnearios de Galicia, en la Casa de Galicia de Madrid, a Don Antonio Ramírez Ortega y a Doña Josefina San Martín Bacaicoa.

* * *

El 18 de enero el Profesor Julio Rodríguez Villanueva fue nombrado Académico de Honor de la Real Academia Sevillana de Ciencias.

* * *

El 22 de enero fue elegido Académico de Número de la Real Academia de Doctores, el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez Gil Hurlé.

* * *

El día 24 de enero de 2005, el Profesor Mario Sapag recibió la distinción de Profesor Emérito en una ceremonia en la cual se recalcaron sus méritos académicos y visión humanista. El distinguido profesor de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas recibió un emotivo homenaje.

* * *

El 27 de enero, en Junta General Extraordinaria, fueron elegidos Doña María Cascales Angosto, Don Albino García Sacristán y Don Alberto Giráldez Dávila, Vicepresidenta, Tesorero y Vicesecretario, respectivamente, de nuestra Institución.

* * *

Del 8 al 16 de febrero, el Profesor Juan Ramón Lacadena, Académico de Número, impartió un Curso en el Instituto de España, titulado: «Genética, Bioética, Sociedad». Temario: Día 8: «Genética y bioética: un diálogo interdisciplinar necesario». Día 9: «Manipulación genética humana y bioética». Día 10: «Genómica: ciencia y ética en el proyecto genoma humano». Día 15: «Bioética global y ética de la responsabilidad». Día 16: «La genética y su proyección social.

* * *

En la semana del 14 al 20 de febrero se ha celebrado en Salamanca el VII Congreso de Farmacia Industrial y Galénica, en la que intervinieron dos Académicos Correspondientes de la RANF, los Profesores José Luis Valverde, de Granada, en la Mesa Redonda sobre «Trasposición de la Legislación Farmacéutica», y Eduardo Mariño, de Barcelona, en la de «Espacio Europeo de Educación Superior para Farmacia».

* * *

El 23 de febrero nos comunican el nombramiento como Doctores «Honoris Causae» por la Universidad de León, de nuestros Académicos de Número, Doctores Salvador Rivas Martínez y Julio Rodríguez Villanueva.

* * *

El día 23 de febrero, la Doctora Doña María Cascales Angosto disertó en la Real Academia de Doctores de España sobre «Premios Nobel de Química, 2004».

* * *

El 24 de febrero ha sido elegido nuevo Académico de Número de nuestra Corporación, el Doctor Mariano Esteban Rodríguez, que ocupará el sillón correspondiente a la medalla número 33.

* * *

El 25 de febrero le ha sido concedida la Gran Cruz de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio, a nuestra compañera, la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto.

* * *

El 21 de marzo se impuso en la Sede del Instituto de España, por la Ministra de Educación, la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio, a la Excma. Sra. Margarita Salas, ex Presidenta del mismo y Académica de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Necrológica

El Excmo. Señor Don Alberto García Ortiz, Académico Correspondiente en Madrid, ha fallecido el día 12 de enero de 2005. Nacido en Buenos Aires (Argentina), el 1 de octubre de 1916, ejerció en Oficina de Farmacia de su propiedad en Madrid desde enero de 1956 y anteriormente en la industria farmacéutica como Director Técnico de los laboratorios MADE. Fue Procurador en Cortes, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Inspector Farmacéutico Municipal y Capitán Farmacéutico honorífico y estaba en posesión de la Gran Cruz de la Orden Civil de Sanidad y de la Encomienda de la Orden de Alfonso X el Sabio.

* * *

El Ilmo. Señor Don Isidoro Rasines Linares, nacido en Matanzas (Cuba), el 18 de junio de 1927, ha fallecido en Madrid el 3 de marzo de 2005. Ingresó como Académico Correspondiente en nuestra Corporación el 13 de marzo de 1986, pronunciando el discurso titulado «Preparación y estudio de nuevos óxidos».

El Doctor Rasines se doctoró en Químicas por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid en 1970, siendo discípulo del Profesor Enrique Gutiérrez Ríos.

Fue Profesor Ordinario de Química Inorgánica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra y Secretario General de dicha Universidad (1969-1980), así como Vocal del Consejo Nacional de Educación en la Sección de Universidades (1964-1967). En el Consejo Superior de Investigaciones Científicas pasó por diferentes estamentos, primero en 1972 como Colaborador, y desde 1979 como Investigador Científico en el Instituto de Química Inorgánica Elhriyar del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Jefe de Unidad «Química Inorgánica Estructural». Desde 1989 como Profesor de Investigación del Instituto de Ciencia de los Materiales pasando, en 1995, a Doctor vinculado *ad honorem* a este Instituto.

El Doctor Rasines era políglota, lo que facilitó sus relaciones científicas internacionales y sus estancias en los Institutos de Quími-

ca Inorgánica de las Universidades de Bonn, Zúrci, Real Escuela Técnica Superior de Estocolmo, Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Michigan (Ann Arbor) y Laboratorio de Cristalografía del CNRS de Grenoble.

La labor investigadora del Doctor Rasines era del más alto nivel y versó sobre nuevos materiales, esencialmente superconductores, y óxidos para baterías de litio. Además contribuyó al desarrollo de la industria farmacéutica mediante la identificación por vez primera de óxidos mixtos catalizadores de numerosas reacciones de interés farmacológico.

El Doctor Rasines asistía con asiduidad a las sesiones científicas de la Corporación y colaboraba activamente en las mismas. El Doctor Rasines se caracterizaba por su trato amable y exquisito. Por su formalidad humana y científica, su pérdida supone un gran vacío para nuestra Academia.

Con nuestro sentimiento a los familiares y el deseo de que se encuentren en la Paz del Señor.

M.^a DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ
Académica Secretaria

Bibliografía

Monasterios, Cartujas y Conventos en las Rutas Compostelanas Españolas.—José de Vicente González y Mariano Azores Torres.—2004.—euroGráficas pichel, sl.—A Coruña.—ISBN: 84-933588-7-8.—343 págs.

En primer lugar, hay que hacer constar que uno de los autores, Don José de Vicente, es Académico Correspondiente de esta Real Academia y de la de Ciencias Veterinarias, lo que sin duda da lugar a que a lo largo del texto e imágenes esté profusamente presente el tema farmacéutico, como se comentará más adelante.

El principal objetivo del libro es, como definen los autores en la Introducción: «...pretendemos hacer un estudio histórico, arqueológico, arquitectónico, heráldico y benéfico-sanitario, alojamiento y asistencia medico-farmacéutica...», lo cual ha sido plenamente cumplido.

Las descripciones y comentarios se hallan distribuidas a lo largo de las tres principales Rutas Compostelanas: la Francesa, que abarca la más conocida desde Roncesvalles hasta Santiago, camino principal de los peregrinos europeos, del que se describen y glosan ampliamente hasta veinte de los aludidos monumentos; la Ruta del Centro, la cual cruza por la mitad la península, de la que se incluyen otros doce; y la Ruta de la Plata, de sur a norte, lindando con la frontera portuguesa, incorpora diez más.

Es de destacar la presentación del libro, de hojas amplias, satinadas y salpicadas con profusión de excelentes fotografías, en número de cerca de 250, a lo que se suman otros tantos blasones heráldicos de cada uno de los lugares o instituciones considerados.

Para nuestra biblioteca tiene especial interés la dedicación que se da al tema farmacéutico, con minuciosa descripción de boticas y reboticas de los monumentos comentados, así como las ilustraciones del material farmacéutico, botamen, albarellos, orzas, vista general de las farmacias e instalaciones pertenecientes a los monasterios y abadías referenciados, incluyendo alguna específica de museos farmacéuticos. Curiosamente, también figura, como una viñeta, un vi-

llancico del mismo tema, escrito por el notable poeta y farmacéutico Don Federico Muelas.

En conjunto, se trata de una publicación de gran prestancia, de presentación impecable y grata a la vista por sus ilustraciones, así como sabrosa a la lectura, por la erudición sobre el tema que manifiestan sus autores.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Dalí y la ciencia.—Santiago Grisolía.—Fundación Valenciana de Estudios Avanzados y Fundación Aventis.—2004.—ENE publicidad.—Madrid.—Depósito legal: M-45509.—68 págs.

La Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, en su colección Club de Debate Sanitario, ha publicado este breve recuerdo en conmemoración del centenario del nacimiento del genial pintor gerundense Salvador Dalí; y tuvo el acierto de encomendar el texto al insigne científico valenciano Profesor Santiago Grisolía, quien lo ha orientado hacia la faceta daliniana de tomar motivos extraídos de los recientes descubrimientos biológicos como sujeto de sus obras artísticas.

Entre las páginas 16 a la 26, el autor comenta seis reproducciones de cuadros de Dalí de motivos bioquímicos, de los cuales son varios los que han sido tomados como encabezamiento de programas de eventos científicos o portadas de libros y revistas especializadas.

No faltan sabrosas citas dalinianas respecto a su relación con el mundo de la ciencia. En una de ellas, el artista dice: «Aunque no soy un científico debo confesar que los acontecimientos científicos son los únicos que guían constantemente mi imaginación...»; mientras, en otra declara: «Mi única ventaja es que yo no sé nada de nada, así que puedo hacer funcionar mis caprichos más caprichosos y más irracionales basándome en mis pequeñas lecturas».

Para completar el libro existe una segunda parte, no relacionada con la ciencia, sino con la Navidad, y son las felicitaciones navideñas que Dalí imprimía anualmente, desde el año 1958 al 1976, en las que

al dibujo surrealista añadía unas frases no menos surrealistas, alusivas al tema, de las que puede valer como ejemplo: «*Una cereza de azúcar gustada debajo del perenne árbol de Navidad hace surgir JUNIO, la plenitud paradójica de las gozosas playas del recuerdo. Dalí, 1971*».

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Ochoa y la Medicina Clínica.—Farmaindustria.—José M.^a Segovia de Arana y Francisco Mora Teruel.—2004.—Depósito legal: M-21.246.—190 págs.

Una publicación más de la *Serie Científica* que con notable acierto edita Farmaindustria, esta vez coordinada por el prestigioso Profesor J. M.^a Segovia de Arana y el neurólogo F. Mora, los cuales escriben los dos primeros capítulos, de los once que constituyen la obra, en los que la sombra del Doctor Severo Ochoa se prolonga a lo largo de todos ellos, ya que el libro está dedicado a la memoria del Profesor Ochoa, en el décimo aniversario de su fallecimiento.

Al elenco de autores, además de los dos ya citados, pertenecen personalidades científicas como Santiago Grisolia, Margarita Salas, César de Haro, Rafael Carmena, Fernando Ortiz Masllorens, Carmen Garcés, Manuel de Oya, Enrique Baca y Manuel Losada Villasante, este último Académico de Honor de nuestra Real Academia Nacional de Farmacia.

Los temas tratados se refieren a Severo Ochoa: como persona y como investigador; a la importancia de sus descubrimientos y la repercusión de la biología molecular en la clínica; a la influencia de los genes y del ambiente en las enfermedades, con ejemplos como la diabetes tipo II, la aterosclerosis, el lupus eritomatoso e, incluso, la Psiquiatría, y otros temas del entorno. Cada uno de los capítulos son, como era de esperar, de un alto nivel científico a la par que didáctico.

Con todo, me es muy grato resaltar el contenido del último de ellos, escrito por el Profesor Manuel Losada, que él ha titulado: «*Mis Bodas de Oro con la Biología*», ya que viene a ser su biografía hu-

mana y científica, por lo cual las referencias a Don José M.^a Alvareda y a Don Severo Ochoa son constantes. El capítulo, escrito con su peculiar elegancia andaluza, empieza con una simple, pero fundamental pregunta: *¿Qué es la vida?* Quien se sienta atraído a conocer la publicación que comentamos, quedará prendado de este capítulo final, por los conceptos que en él se vierten y por acompañar, desde su juventud, el desarrollo y plenitud de la vida de un gran científico, que fue enseñado y dirigido por dos maestros egregios. De hecho, refiriéndose a ellos —a los que suma la figura también promotora de la ciencia en España, de Don Manuel Lora-Tamayo—, el autor los califica como «maestros a imitar y seguir, aunque inimitables e inalcanzables».

Es de agradecer que una institución no específicamente científica como es Farmaindustria, cuente entre sus actividades la publicación de obras como ésta y como las que le han precedido en la colección *Serie Científica*.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Farmacopea Internacional.—3.^a edición.—Organización Mundial de la Salud.—2004.—CD-ROM Creation.—ISBN: 92-4-056021-1.—1.704 págs.

La Farmacopea Internacional es una compilación de procedimientos recomendados para el análisis y de especificaciones para la determinación de las sustancias farmacéuticas, los excipientes y las formas farmacéuticas; está destinada a servir como fuente de referencia o adaptación para cualquier Estado Miembro de la OMS que desee establecer requisitos de farmacopea.

Esta edición se presenta en CD-ROM de 60,2 MB, escrita en tres idiomas: inglés, francés y español. Ha sido producida por el Departamento de Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica de la OMS con la ayuda de Human Info ONG y su unidad logística HumanityCD. Tiene como principales enlaces los siguientes ítems:

Tabla de contenidos/Buscar/Monografías/Métodos generales/Reactivos/Índice, desde los que se puede navegar por toda la obra.

La cual consta de cinco volúmenes: el Volumen 1 contiene métodos de análisis generales en sus 223 páginas (WHO 1996); Volúmenes 2 y 3, de 342 y 407 páginas, respectivamente (WHO 1996), contiene las normas de calidad para la mayoría de sustancias esenciales de los medicamentos incluidos en la lista «Modelo de medicamentos esenciales de la OMS»; Volumen 4, información sobre pruebas, métodos y requisitos generales y especificaciones de la calidad para las sustancias, los excipientes y las formas farmacéuticas, 343 páginas (WHO 1996). El Volumen 5 contiene pruebas y requisitos generales para formas farmacéuticas y normas de calidad para sustancias bioactivas y para comprimidos —que completan prácticamente la lista de monografías para las sustancias farmacéuticas activas— y una sección de medicamentos antipalúdicos y sus formas farmacéuticas más ampliamente usadas, 383 páginas (WHO 2003). Este volumen está disponible sólo en inglés.

Tan amplia obra, con la comodidad del formato informático, resulta de gran utilidad para los laboratorios que deseen ajustarse a las especificaciones de ámbito internacional mundial.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

PET-TAC: Indicaciones, revisión sistemática y meta-análisis.—Rodríguez Garrido, Manuel, y Asensio del Barrio, Cristina.—2004.—Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Informe número 41.—131 págs.—ISBN: 84-95463-25-3.

Se trata de un estudio meta-analítico de las ventajas y aplicaciones de dos técnicas de imagen: la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y la Tomografía Axial Computerizada (TAC), ejecutadas simultáneamente mediante un único dispositivo, en comparación con los resultados de ambas técnicas realizadas por separado.

Para su elaboración se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica, seleccionando los artículos más adecuados. De los 209 recuperados se utilizaron para el meta-análisis los doce estudios prospectivos y cuatro retrospectivos.

En el texto se detallan los métodos seguidos en el meta-análisis y las estrategias seguidas para el análisis cualitativo y la síntesis de

los estudios, lo que permite obtener los parámetros cuantitativos, que vienen resumidos en 31 Tablas y 12 Gráficas.

De la discusión de los datos obtenidos en el estudio analítico verificado se ha deducido que la técnica PET-TAC es muy útil en el diagnóstico de tumores malignos iniciales y recidivas, ya que aumenta el nivel de confianza en el diagnóstico al disminuir de forma significativa el número de lesiones equívocas o no concluyentes. Por estas propiedades supera los resultados de dichas técnicas cuando se aplican por separado.

Por otra parte, la PET-TAC presenta otras ventajas como: reducir el número y tiempos de exploraciones, lo que supone mayor comodidad para los pacientes; el evitar operaciones quirúrgicas u otros tratamientos no efectivos; el simultanear una tecnología funcional (PET) con otra anatómica (TAC); y evitar la falta de alineación postural y posicional de los pacientes cuando se aplican las técnicas por separado.

Por todo ello se prevé que la aplicación del PET-TAC puede resultar coste-efectiva, si bien, falta realizar el estudio correspondiente para confirmar este importante aspecto.

Finalmente, se comentan las principales indicaciones en función de la localización de los tumores, con las ventajas específicas en cada caso.

Existe al principio del libro un Listado de abreviaturas, el cual, a nuestro juicio, puede ser mejorable, pues de hecho en el texto aparecen una serie de abreviaturas que no figuran en dicho listado.

ALBERTO GIRÁLDEZ

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Características

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral en la que se considerarán para publicación aquellos trabajos relacionados con los diversos campos de las ciencias farmacéuticas y afines, orientadas a la investigación básica o aplicada.

2. Fundamentalmente, la revista constará de las siguientes secciones:

REVISIONES: Se dedicará a estudios de actualización y puesta a punto de distintos temas, siendo realizados por personas expertas en cada tema y a petición de la Comisión de Publicaciones. Podrán aceptarse revisiones y artículos doctrinales no solicitados, después de una consideración particular por parte del Consejo de Redacción.

ARTÍCULOS ORIGINALES: Se publicarán aquellos trabajos de investigación con interés en el campo de las ciencias farmacéuticas y afines, que no hayan sido publicados previamente. Su exposición se ajustará a un estilo conciso y la extensión dependerá del volumen de resultados, que deberán ser rigurosos y originales en su aportación.

COMUNICACIONES BREVES: Incluirán la descripción de observaciones y resultados de investigaciones en curso, cuyo interés justifique el que los autores quieran dar una rápida noticia. Su texto no excederá de cinco hojas A4 (a doble espacio), con 2-3 figuras/tablas como máximo y sin sobrepasar 10-12 referencias abreviadas en su bibliografía.

INFORMACIÓN ACADÉMICA: Dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros y otras visicitudes académicas, así como otras informaciones o novedades editoriales que la revista juzgue puedan ser de interés para los lectores.

B. Instrucciones para la preparación de manuscritos

1. **PRESENTACIÓN.** De cada trabajo se enviarán a la Secretaría de la Real Academia Nacional de Farmacia un original y dos duplicados. Asimismo, se remitirán los originales escritos y grabados en Word.

En la primera página se hará constar: Título del trabajo (en español y en inglés), autores y centro donde se ha realizado el trabajo, incluyendo su dirección, teléfono y correo electrónico si lo tiene. También se incluirá un título abreviado en 3 ó 4 palabras.

En la segunda página se repetirá el título del trabajo y se incluirá un resumen (máximo 200 palabras) en español y en inglés. A continuación de los resúmenes se incluirá hasta un máximo de 5 palabras claves.

Los trabajos de revisión, en español o inglés, deberán aportar un amplio resumen (1-2 hojas A4) en el otro idioma distinto al que se ha redactado el trabajo «in extenso», que, además, irá acompañado de su resumen normal (máximo 200 palabras).

2. **REDACCIÓN DEL TEXTO.** Los originales se presentarán en A4 a un espacio, con el siguiente formato: tipo de letra «Times New Roman»; tamaño: 12. Márgenes: superior, 6 cm.; inferior: 6 cm.; izquierda: 4,2 cm.; derecha: 4,2 cm. Encabezado y pie de página: 5,2 cm. Número de palabras: 10.000. Máximo de páginas: 30. Ilustraciones: 8 máximo.

En los trabajos experimentales se recomienda la presentación de una parte crítica o introducción, una parte experimental y una discusión de los resultados. También, cuando se considere necesario, podrá incluirse un apartado de agradecimientos.

La introducción, en la cual se expondrán los fines y objetivos, deberá ser lo más breve posible. Se hará referencia explícita a todo trabajo anteriormente pu

blicado por el mismo autor o por otro autor si el conocimiento de esos trabajos es esencial para situar, en el desarrollo científico, el texto presentado. La parte experimental no deberá contener más que los datos necesarios para la reproducción de los experimentos.

En las Comunicaciones breves, la justificación, planteamiento del problema, método y resultados, junto con sus comentarios, irán redactados siguiendo un proceso argumental lógico y sin distinción de apartados. Irán acompañados de un breve resumen en español y en inglés.

3. SÍMBOLOS. En la redacción el autor se atenderá a las normas S.I. (Sistema Internacional) en lo que respecta a unidades, símbolos y abreviaturas.

4. BIBLIOGRAFÍA. Las citas bibliográficas irán al final del original, correlativamente numeradas, por orden de aparición en el texto. Tamaño letra: 10.

Para la denominación de las revistas, se utilizarán las abreviaturas publicadas por Chemical Abstracts, Bibliographic Guide for Editor & Authors. C.A. 1974.

Los siguientes ejemplos pueden servir de modelo:

a) Para artículos publicados en revistas:

Autor en versales; título de la revista en cursivas:

DUNNE, A. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 97-101.

b) Para libros:

Autor en versales; título del libro en letra normal:

BARTOS, J. Y PESEZ, M. (1984) *Practique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique*. 2ª édition. Masson. París.

5. TABLAS Y FIGURAS. Salvo casos muy excepcionales, no se emplearán simultáneamente ambas formas de expresión. El número de figuras se limitará al mínimo, procurando yuxtaponer aquellas gráficas que, sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.

Las figuras podrán enviarse sobre papel, en fotografía, en diapositiva o en

disco en formato TIFF, JPG... Los autores indicarán la reducción de las figuras que estimen conveniente.

La rotulación será del tamaño adecuado para que, una vez reducida la figura, resulte de 1,5 mm de altura.

Los pies de las figuras, suficientemente explicativos, deberán enviarse en una página al final del trabajo.

La situación aproximada de las figuras en el texto deben señalarse mediante un recuadro: debajo de este recuadro se indicará el número de la figura.

6. CARACTERES DE IMPRENTA. Se ruega a los autores que expresen, en sus originales, los estilos de caracteres de letra que deban emplearse de acuerdo con las indicaciones siguientes:

— Subrayar con una línea — las palabras en *cursiva*.

— Subrayar con dos líneas == las palabras en **VERSALITAS**.

— Subrayar con tres líneas === las palabras en **VERSALES**.

— Subrayar con una línea las palabras en **negritas**.

7. EXAMEN DE MANUSCRITOS. La comisión de publicaciones, que examinará los manuscritos, devolverá a los autores aquellos cuyo contenido no se adapte al habitual de la Revista o no se ajuste a las presentes normas, solicitando, en todo caso, las modificaciones que estime oportunas.

8. PRUEBAS. Deberán devolverse debidamente corregidas, en un plazo máximo de ocho días a partir de la fecha de envío, pasado el cual perderá el trabajo su turno de publicación. En la corrección de pruebas, que deberá realizarse con gran atención, no se admitirán modificaciones del texto original.

9. CUOTAS DE PUBLICACIÓN. La publicación del trabajo implica el pago por los autores o Centros de trabajo, de una cuota que corresponde sólo al coste parcial de los gastos de composición, exceptuándose aquellos artículos que fueran requeridos por los editores.

RULES FOR ORIGINALS PUBLICATION

A. Characteristics

1. *NATIONAL PHARMACY ROYAL ACADEMY ANNALS* is a quarterly magazine. In order to be published, the mentioned magazine will take into account the works done in connection with the pharmaceutical science and related areas, linked to basic and applied research.

2. The magazine will mainly include the following sections:

REVIEWS: performed by specialists and by request of Publication Commission, will be dedicated to updating and final preparation surveys. After due consideration of the Board of Editing could be accepted reviews and not requested doctrinal articles.

ORIGINAL ARTICLES: not previously published surveys in connection with pharmaceutical science and related areas, will be edited. The wording has to be concise and the extent will depend on the results. The mentioned results are to be rigorous and original.

BRIEF COMMUNICATIONS: have to include a description of the remarks and the status of the research in course. The text will not exceed from five pages (paper size A4), (doubled-spaced), with a maximum of two-three graphs/tables, and including 10-12 bibliographic abbreviated references at maximum.

ACADEMIC INFORMATION: will inform about the different courses, scientific sessions and others, which the magazine deem necessary.

B. Operating instructions

1. **PRESENTATION.** One original and two copies have to be delivered to the NATIONAL PHARMACY ROYAL ACADEMY SECRETARY. In addition to this, the original electronic format (WORD) has to be provided.

First page: will include the following: Title of the survey (in English and in Spanish), authors, and the complete ad-

dress (e-mail and telephone included) of the working center where the survey has been developed. Moreover, it has to be included an abbreviated title, three or four words.

Second page: include a repetition of the title and a summary (maximum 200 words), both in English and Spanish. Summaries will be followed by a maximum of five key words.

The review surveys, in Spanish or in English, have to include an extensive summary (1-2 sheets, size A4) in the language different from the original one. In addition to this, the standard summary has to be included (maximum 200 words).

2. **WRITING.** Original documents have to be typewritten single-spaced using A4 paper, with the following format: Letter type: Times New Roman; size: 12 points; margin superior: 6 cm, inferior: 6 cm; left: 4,2 cm, right: 4,2 cm; headed: 5,2 cm and foot of page: 5,2 cm. Number of words: 10.000. Maximum of pages: 30. Illustrations: 8 as maximum.

It is recommended to include a critical section, an experimental section and a discussion of the results. Additionally, when deemed necessary, may be included a thanks giving appendix.

The introduction must include the aims and the objectives and be as brief as possible.

A reference to prior surveys, from the author or from third parties, has to be made in connection with the current survey, if it is deemed necessary to a better comprehension of the work.

The experimental part has only to include the needed data to re-perform the experiments.

Regarding short communications, the justification, the approach, the methodology, the results, and related comments, have to be written following a logical process (it is required not to include separations on the mentioned process). A brief summary in English and Spanish language is required.

3. SYMBOLS. When writing the author is subjected to International System of Symbols regarding units, symbols and abbreviations.

4. BIBLIOGRAPHY. The bibliographic references have to be illustrated at the end of the original documents, consecutively numbered. Letter size: 10.

The names of the magazine will be taken from the published abbreviations of Chemical Abstracts, Bibliographic Guide for Editor & Authors. C.A. 1974.

Set out below are some model-examples:

a) *Articles published at magazines.* Author name in Small capital letter and title of the magazine in *Italics*: Dunne, A. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* 38:97-101.

b) **Books.** Author name in Small capital letter and title of the book in standard format: BARTOS, J. y PESEZ, M. (1984) *Practique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique.* 2^a édition. Masson - París.

5. TABLES AND GRAPHS. A joint use is not allowed except for exceptional reasons. A minimum use of graphs is required. The graphs, when possible, must be based on the same axis structure.

The graphs can be delivered by paper, photography, slide or in a disc (format TIFF, JPG, ...). The authors must indicate the appropriate size of the graphs.

The required size of the graph is 1.5 millimetre high.

The footnotes are required to be shown on a separate page at the end of the survey.

The location of the graphs must be indicated through a frame.

A footnote showing the number of the graph is required.

6. TYPE. The authors must provide in their original works the different type of letters used in accordance with:

— Single underline - *Italics*.

— Double underline - SMALL CAPITAL

LETTERS.

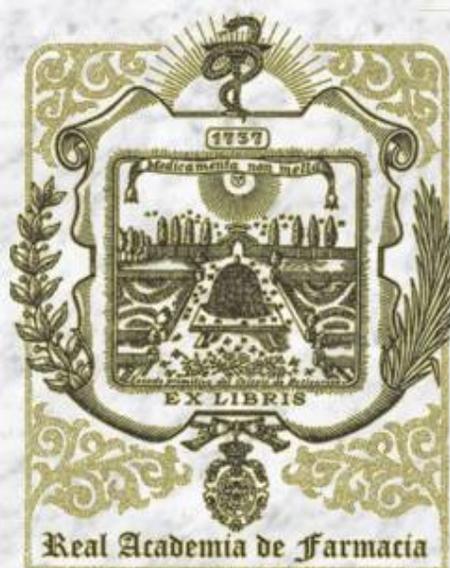
— Triple underline - CAPITAL LETTERS.

— Single underline - **black**.

7. Review of surveys. The Magazine Committee will review the surveys. The works which do not comply with the mentioned rules will be sent back with a list of modifications required.

8. TESTS. As a result of the abovementioned review, the amended document must be delivered within eight days beginning at the date of the return. Apart from the required modifications, amendments will not be accepted.

9. PUBLICATION RATE. As a result of the publication, and taking into account the different costs involved in the mentioned publication, a publication rate is required. The publication rate is not applicable to surveys requested by the editors.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com