

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 87. NÚMERO 2 (2021) · ABRIL - JUNIO
ACCESO ABIERTO





ANALES

RANF

REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

AÑO 2021 - NÚMERO 02

DOI: 10.26434/chemrxiv-2021-16974

J.SSN: 1697-428X / E-ISSN: 1697-428X

VOLUMEN 87. NÚMERO 2 (2021) · ABRIL - JUNIO

SUMARIO

EDITORIAL

M^a TERESA MIRAS PORTUGAL (1948-2021). IN MEMORIAM
ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO

COMENTARIOS

QUIMERAS MACACO-HUMANAS:
ASPECTOS CIENTÍFICOS Y CONSIDERACIONES BIOÉTICAS
JUAN RAMÓN LACADENA CALERO

DECADENCIA DEL ARTE CLÍNICO Y AUGE DE LA MEDICINA TECNOLÓGICA
JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ MONTES

FIGURAS DE LA CIENCIA

OTTO LOEWI: CIENTO AÑOS DE LA CONFIRMACIÓN
DE LA NEUROTRANSMISIÓN QUÍMICA
ALBINO GARCÍA SACRISTÁN

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTESTINAL MEDIANTE
LA INGESTA DE COMPUESTOS DE MAILLARD Y SU INTERACCIÓN CON
LOS RECEPTORES RAGE Y GPR43
SILVIA PASTORIZA Y JOSÉ ÁNGEL RUFÍAN-HENARES

RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL DE UNA β -LACTAMASA Y
COMPARATIVA CON SUS HOMÓLOGOS ACTUALES
GONZALO FERNÁNDEZ BALAGUER, CARMEN DEL ÁGUILA,
RUBÉN AGUDO Y CAROLINA HURTADO

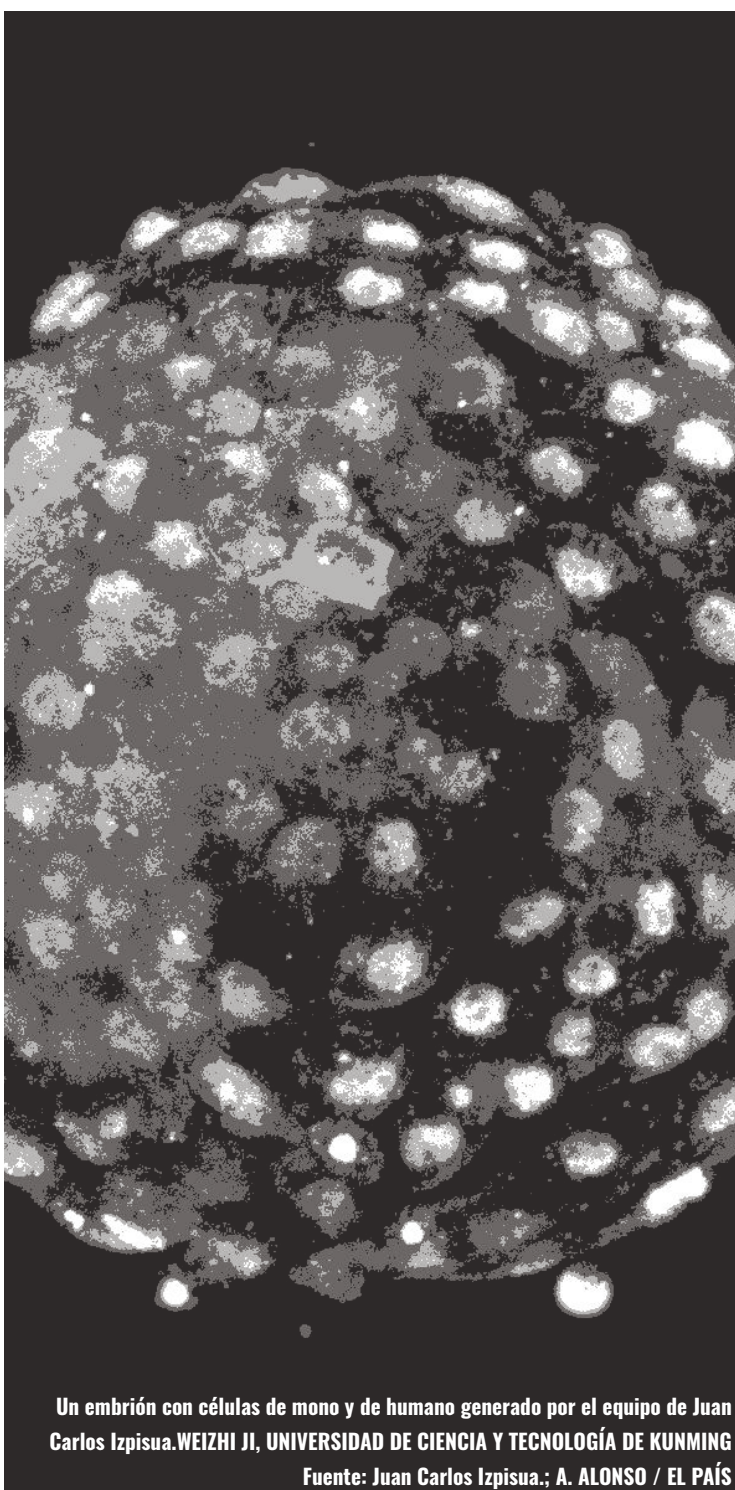
REVISIONES

FARMACIA Y PLANTAS MEDICINALES EN LA LITERATURA:
CASO DE GARCÍA MÁRQUEZ
FRANCISCO JOSÉ GONZÁLEZ MINERO Y LUIS BRAVO DÍAZ

CONSIDERACIONES SOBRE LA INNOVACIÓN
INCREMENTAL EN MEDICAMENTOS
EMILI ESTEVE SALA

ALIMENTACIÓN SALUDABLE Y SOSTENIBLE EN
TIEMPOS DE LA PANDEMIA COVID-19
MARÍA MONTAÑA CÁMARA HURTADO

EL ESCUALENO, UNA MOLÉCULA PALPITANTE A PESAR DE
LOS CIENTO CINCO AÑOS DE SU DESCUBRIMIENTO
JESÚS DE LA OSADA GARCÍA



Un embrión con células de mono y de humano generado por el equipo de Juan Carlos Izpisua. WEIZHI JI, UNIVERSIDAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE KUNMING
Fuente: Juan Carlos Izpisua.; A. ALONSO / EL PAÍS

Revista editada por:

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)
Teléfonos: 91 531 65 51
I.S.S.N 1697-428X



Presidente Comité Editorial

Doadrio Villarejo, Antonio L.
Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Directora Ejecutiva

Salaices Sánchez, Mercedes.
Vicesecretaria de la Real Academia Nacional de Farmacia

Editor Científico

Menéndez Ramos, José Carlos
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Consejo Editorial

Avendaño López, Carmen
Ribas Ozonas, Bartolomé
Villar del Fresno, Ángel María
Lacadena Calero, Juan Ramón
Francés Causapé, M^a Del Carmen
Pascual-Leone Pascual, Ana María
Rodríguez-Boto, Gregorio
Salinas Sánchez, Jesús
Académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia

Coordinación RANF

Manuel Tirado Juárez

Coordinación ARP

Luis Javier Aróstegui Plaza

Diseño web

Montse López Ferres

Diseño revista

M. Nieves Gallardo Collado

Consejo Editorial

Tamargo Menéndez, Juan
Mayor Zaragoza, Federico
Rodríguez Artalejo, Antonio
Puerto Sarmiento, Javier
García Sacristán, Albino
Vilas Sánchez, Vicente
Nombela Cano, César
del Castillo García, Benito
Sentandreu Ramón, Rafael
Sánchez Muniz, Francisco José
Abelló Gallo, Juan
Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel
Basante Pol, Rosa
Alonso Fernández, María José
Ortiz Melón, José Miguel
Giménez Gallego, Guillermo
Medina Jiménez, José M^a
Cerdán García-Esteller, Sebastián
Barcina Angulo, Yolanda
Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso
Esteban Rodríguez, Mariano
Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio
Sanz Pérez, Bernabé
Guinovart Cirera, Joan J.
Vallet Regí, María
Martínez Fernández, Antonio Ramón
Miras Portugal, M^a Teresa
Manzanares Robles, Jorge
Gómez-Serranillos Cuadrado, M^a Pilar
González Bueno, Antonio I.

Comité Científico Internacional

Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)
Prof. Lucette Bardet (Francia)
Kazuhiro Imai (Japón)
Fernando Quevedo Ganoza (Perú)
Vicenzo Tortorella (Italia)
Bernard Portha (Francia)
Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)
Herbert Zimmermann (Alemania)
Adolfo Pérez Miravete (Méjico)
Carl - Göran Eden (Suecia)

ÍNDICE

EDITORIAL

p. 115
M^a TERESA MIRAS PORTUGAL (1948-2021). IN MEMORIAM
ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO

COMENTARIOS

p. 117 - 121
QUIMERAS MACACO-HUMANAS: ASPECTOS CIENTÍFICOS Y CONSIDERACIONES BIOÉTICAS
JUAN RAMÓN LACADENA CALERO

p. 123 - 133
DECADENCIA DEL ARTE CLÍNICO Y AUGE DE LA MEDICINA TECNOLÓGICA
JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ MONTES

FIGURAS DE LA CIENCIA

p. 135 - 154
OTTO LOEWI: CIENTO AÑOS DE LA CONFIRMACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN QUÍMICA
ALBINO GARCÍA SACRISTÁN

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

p. 141 - 153
REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTESTINAL MEDIANTE LA INGESTA DE COMPUESTOS DE MAILLARD Y SU INTERACCIÓN CON LOS RECEPTORES RAGE Y GPR43
SILVIA PASTORIZA Y JOSÉ ÁNGEL RUFIÁN-HENARES

p. 155 - 170
RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL DE UNA B-LACTAMASA Y COMPARATIVA CON SUS HOMÓLOGOS ACTUALES
GONZALO FERNÁNDEZ BALAGUER, CARMEN DEL ÁGUILA,
RUBÉN AGUDO Y CAROLINA HURTADO

REVISIONES

p. 171 - 183
FARMACIA Y PLANTAS MEDICINALES EN LA LITERATURA: CASO DE GARCÍA MÁRQUEZ
FRANCISCO JOSÉ GONZÁLEZ MINERO Y LUIS BRAVO DÍAZ

p. 185 - 193
CONSIDERACIONES SOBRE LA INNOVACIÓN INCREMENTAL EN MEDICAMENTOS
EMILI ESTEVE SALA

p. 195 - 204
ALIMENTACIÓN SALUDABLE Y SOSTENIBLE EN TIEMPOS DE LA PANDEMIA COVID-19
MARÍA MONTAÑA CÁMARA HURTADO

p. 205 - 211
EL ESCUALENO, UNA MOLÉCULA PALPITANTE A PESAR DE LOS CIENTO CINCO AÑOS DE SU DESCUBRIMIENTO
JESÚS DE LA OSADA GARCÍA

M^a TERESA MIRAS PORTUGAL (1948-2021). IN MEMORIAM

M^a TERESA MIRAS PORTUGAL (1948-2021). IN MEMORIAM

Antonio Luis Doadrio Villarejo

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España

corresponding author: presidencia@ranf.com

EDITORIAL

Una gran tristeza envuelve a nuestra Institución por la pérdida de su presidenta de honor, la Excm. Sra. D^a M^a Teresa Miras Portugal. Destacada docente y científica, gallega de nacimiento, madrileña de adopción y de dimensión universal, fue la primera y, hasta ahora, única mujer en presidir nuestra Academia. Su presidencia coincidió coetáneamente con el que suscribe como secretario general. La labor que realiza una Real Academia del Instituto de España se basa en esos dos pilares, presidente y secretario que, juntos, iniciamos un viaje para que nuestra Institución estuviera presente, sin complejo alguno, dentro de la sociedad del siglo XXI. Las Reales Academias, deben prestar un servicio útil a la sociedad civil y asesorar al gobierno de nuestra nación para, en nuestro caso, contribuir a mejorar todos los aspectos del mundo del medicamento y sanitarios. La línea de actuación de M^a Teresa fue acorde con esos principios básicos, realizando una gran labor, no exenta de dificultades por los recortes presupuestarios realizados por el gobierno desde 2008. A pesar de todo, con un gran entusiasmo y un optimismo contagioso, abordó proyectos como el de la asignación de metadatos a los registros digitales de nuestra biblioteca virtual, lo que proporciona la máxima visibilidad a cada una de las obras digitalizadas, la renovación de nuestros Anales en forma de Open Journal en formato digital o la catalogación de todo el contenido de nuestro Museo. Se preocupó mucho por intentar aumentar la calidad de nuestras sesiones científicas públicas, así como de nuestras publicaciones lo que, en mi opinión, creo consiguió, a pesar de que el listón estaba muy alto. También trabajó desde la Academia para unir lazos científicos con las académicas autonómicas y extranjeras de farmacia.

Se nos ha ido una gran académica, científica, docente y amiga que, dejando un enorme vacío, nos proporciona un recuerdo imborrable en nuestra memoria. Las personas pasamos, pero la Institución continúa y lo hace con la riqueza de contenidos que supone su inestimable legado.

D.E.P

QUIMERAS MACACO-HUMANAS: ASPECTOS CIENTÍFICOS Y CONSIDERACIONES

BIOÉTICAS MACAQUE-HUMAN CHIMERAS: SCIENTIFIC ASPECTS AND BIOETHICAL REFLECTIONS

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España

corresponding author: jrlgbucm@bio.ucm.es

COMENTARIO

RESUMEN

Se describe la obtención de embriones quiméricos macaco-humanos por Izpisua y colaboradores (2021) mediante la inyección de células troncales pluripotentes humanas en blastocistos de macaco cultivados *ex vivo* y se analiza el destino de las líneas celulares humanas en su desarrollo posterior hasta el día 19 después de la fecundación. Se hace una reflexión bioética sobre la relación científica en general y sobre dicha investigación en particular.

ABSTRACT

The obtention by Izpisua and collaborators (2021) of macaque-human chimeric embryos by microinjection of human pluripotent stem cells into early blastocysts of cynomolgus monkey is described. They studied the competency of human pluripotent stem cells in macaque embryos cultured ex vivo until 19 days post-fertilization. A reflection on these experiments is made from the bioethical point of view.

Palabras Clave:

Quimera

Embrión quimérico macaco-humano

Células troncales pluripotentes humanas

Cultivo embrionario *ex vivo*

Bioética

Keywords:

Chimera

Macaque - human chimeric embryo

Human pluripotent stem cells

Ex vivo embryo culture

Bioethics



1. ASPECTOS CIENTÍFICOS

Etimológicamente, el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua (2020) define *quimera* como “aquello que se propone a la imaginación como posible o verdadero, no siéndolo” cuyo origen en la mitología clásica es un “monstruo imaginario que vomitaba llamas y tenía cabeza de león, vientre de cabra y cola de dragón”.

Desde el punto de vista genético, por quimera se entiende el organismo que contiene células, tejidos u órganos de diferente constitución genética (genotipo) procedentes de individuos distintos por fusión embrionaria o por transferencia de células, tejidos u órganos.

Las *quimeras* pueden ser intraespecíficas o interespecíficas. Por ejemplo, una persona con un trasplante de órganos (riñón, pulmón, hígado, etc.) o un injerto de tejidos es una quimera intraespecífica y una persona a la que le han colocado una válvula cardíaca de cerdo es una quimera interespecífica.

No hay que confundir las quimeras con los híbridos originados por reproducción sexual ni con los mosaicos genéticos producidos por mutación o recombinación somáticas. A mí me resulta sorprendente que una revista tan prestigiosa como *Nature* (1) haya utilizado el término *hybrid* en vez de *chimaera* o *chimaeric* en un comentario editorial sobre el trabajo recientemente publicado por Izpisua y colaboradores (2). En mi opinión, hay que ser muy preciso en la utilización de los términos correctos.

El pasado día 15 de abril se publicó en la revista *Cell* un artículo del grupo de investigación coordinado por el Dr. Juan Carlos Izpisua Belmonte, Académico de Honor de esta Real Academia Nacional de Farmacia desde 2016. Firman el artículo 24 científicos pertenecientes a varios centros de investigación diferentes: State Key Laboratory of Primate Biomedical Research (China), Salk Institute for Biological Studies, La Jolla (USA) y Universidad Católica San Antonio de Murcia (España). La investigación trata de la introducción de células troncales pluripotentes humanas (hPSC) en embriones de macacos (*Macaca fascicularis*) en fase de blastocistos con objeto de estudiar la capacidad de supervivencia de las células humanas en el embrión de macaco con vistas a una posible futura utilización de esta técnica para aplicaciones en la Medicina regenerativa, llegando hipotéticamente al trasplante de órganos.

La técnica utilizada, que había sido desarrollada en años anteriores (3,4), permite cultivar *ex vivo* embriones de primates (y embriones humanos también, aunque no es éste el caso) hasta la fase de gástrula, para ello se elimina la zona pelúcida de manera que el blastocisto desnudo puede adherirse a la placa de cultivo

para su ulterior desarrollo, permitiendo seguir la pista de las células troncales pluripotentes humanas reprogramadas (“*extended*”, hEPSC). Así, 6 días después de la fecundación (dpf) inyectaron 132 embriones con hEPSCs de los que 91 permanecieron vivos a los 11 dpf, descendiendo a 12 a los 17 dpf y quedando solamente 3 el día 19 dpf. Las células troncales pluripotentes humanas (hPSC) son capaces de renovarse ilimitadamente en cultivo y generar cualquier tipo de célula adulta. En su estudio, Izpisua y colaboradores observaron que las células troncales pluripotentes humanas reprogramadas (hEPSC) proliferaron dentro del embrión, generando varias líneas celulares que se integraron en la masa celular interna (ICM) de embriones de macaco en fase de blastocisto tardío, contribuyendo tanto a líneas celulares embrionarias como extraembrionarias en fases de peri-implantación y de post-implantación temprana.

También descubrieron sucesos de señalización que indican una comunicación interespecífica que puede ayudar a conformar un patrón de desarrollo único de las células humanas y de macaco en el embrión quimérico. Añaden los autores, además, que estos resultados pueden ayudar a comprender mejor el desarrollo humano temprano y la evolución de los primates y a desarrollar estrategias para mejorar el quimerismo humano en especies evolutivamente distantes.

A partir del día 13 post-fecundación (dpf), las células tendían a agruparse juntas y separarse de la capa EPI (epiblasto) del mono. Estas células humanas parecían diferenciarse en células de gástrula. Las células hEPSCs mostraban una razonable contribución al epiblasto con una contribución máxima del 7,08% el día 15 dpf y algo menor al hipoblasto, alcanzado un máximo del 4,96% el día 19 dpf. Sin embargo, la contribución al trofoectodermo en embriones peri- y post-implantatorios fue limitada. Se estima que a los 19 días después de la fecundación los embriones quiméricos tienen unas 10.000 células con un máximo de un 7% de células humanas. Para analizar el patrón de desarrollo de los embriones quiméricos, se hicieron análisis de secuenciación de ARN en simples células (scRNA-seq), permitiendo estudiar el perfil de los transcriptomas de 227 células humanas y 302 células de macaco en diferentes etapas del desarrollo entre los días 9 y 17 dpf.

Como antecedentes a la investigación actual, cabe indicar que el Dr. Izpisua Belmonte y colaboradores ya habían obtenido quimeras interespecíficas (ratón-rata, cerdo-humano, vaca-humano) en los años 2016 y 2017 (5, 6). La técnica general consiste en introducir mediante microinyección en embriones en fase de blastocisto de una especie células troncales pluripotentes de la otra especie. Así, obtuvieron embriones quiméricos de cerdo con células humanas con la idea de comprobar si era posible obtener



cerdos adultos con un órgano humano apto para ser utilizado como trasplante. Para ello, copiando el modelo que habían obtenido ya en quimeras de ratón y rata, en el que a un blastocisto de ratón portador de una mutación que le impedía formar el páncreas se le inyectaron células troncales pluripotentes de rata, obtuvieron ratones quiméricos viables con páncreas de rata. Copiando el modelo, se pro hitrataba ahora de obtener embriones de cerdo portadores de una mutación que les impidiera formar el páncreas a los que se les introducía las células pluripotentes humanas con la esperanza de que alguna de ellas diera lugar al desarrollo del páncreas humano en el cerdo quimérico. Sin embargo, quizá debido a la distancia evolutiva de las especies en juego (cerdo y humano), el intento fracasó por la baja proporción de células humanas en el embrión quimérico (1 por cada 100.000). Por ello decidieron intentar algo semejante pero utilizando una especie evolutivamente más próxima a la especie humana: el macaco (*Macaca fascicularis*). Así, obtuvieron los 132 embriones antes mencionados con 110 células cada uno a los que añadían 25 células troncales pluripotentes humanas reprogramadas (hEPSC).

Aquí saltaron las alarmas: una cosa es obtener embriones quiméricos de cerdo con células humanas que después en el desarrollo pudieran dar lugar a tejidos u órganos humanos, y otra es que el embrión quimérico fuera de macacos o, quién sabe si más adelante, fuera de chimpancé, orangután o gorila. ¿Es ciencia-ficción? Para mí, sí lo es, pero en cualquier caso, el debate ético está servido.

2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Dada su proximidad evolutiva, desde hace mucho tiempo se ha planteado la posibilidad de unir los patrimonios genéticos de la especie humana y de alguna especie de primate o de simio. Así, el zoólogo Iliá Ivánovich Ivanov, en los años veinte del siglo pasado, se propuso obtener híbridos de chimpancé y humano mediante inseminación artificial en África de mujeres con espermatozoides de mono. Afortunadamente, por circunstancias diversas, no pudo llevar a cabo su propósito.

Pierre Savatier y colaboradores, de la Universidad de Lyon, publicaron hace pocos meses un intento de crear embriones quiméricos de macaco y humano, llegando a obtener a los 7 días estructuras embrionarias de mono de unas 250 células con un máximo de 10 células humanas (7). En este trabajo participó el Dr. Manuel Serrano del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRBB).

Hagamos unas reflexiones éticas básicas utilizando algún aforismo, definido por la RAE (2020) como una “*máxima o senten-*

cia que se propone como pauta en alguna ciencia o arte”. En lo que sigue utilizaré las reflexiones sobre “Ciencia y Ética” que hice en una ocasión anterior (8).

En relación con la ética de la investigación hay que considerar que todos aceptamos que “*la libertad de pensamiento y la libertad de expresión son sagradas y de ellas deriva la libertad de investigación*”.

Cuando se dice que “*la Ciencia es imparable*” debemos tener en cuenta que tiene un doble significado: bien que “el progreso científico es continuo” o bien que “los científicos no están dispuestos a parar”, lo cual puede implicar problemas bioéticos.

La realidad nos dice que “*tratar de detener el progreso científico es como querer poner puertas al campo*”; es decir, imposible porque “*todo lo que se pueda hacer se hará*” o, en términos de imperativo tecnológico, “*todo lo que se puede hacer, hay que hacerlo*”. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta en el debate bioético que “*no todo lo que es técnicamente posible, puede que sea éticamente deseable*”, que “el fin no justifica los medios” y que “cuando no se podía hacer, era fácil plantearse si no debería hacerse”.

En relación con el imperativo tecnológico antes mencionado (“*todo lo que se pueda hacer, hay que hacerlo*”), me parece interesante recoger aquí las palabras de Hans Jonas en su obra *El Principio de Responsabilidad. Ensayo de una ética para la civilización tecnológica* (1979).

“La tesis de partida de este libro es que la promesa de la técnica moderna se ha convertido en una amenaza, o que la amenaza ha quedado indisolublemente asociada a la promesa... Lo que hoy puede hacer el hombre —y después, en el ejercicio insoslayable de ese poder, tiene que seguir haciendo— carece de parangón en la experiencia pasada”. No es lo mismo investigar con células somáticas, tejidos u órganos que investigar con embriones. No obstante, en este caso, hay que señalar que en esta investigación no se trata de embriones humanos con células de mono sino de embriones de mono con células humanas. En cualquier caso, el peligro hipotético está en que al introducir las células troncales pluripotentes humanas con capacidad de originar cualquier tejido u órgano podemos preguntarnos, en un alarde de ciencia-ficción, qué ocurriría si se llegara a obtener en la investigación un ser no humano con cerebro humano: algo así como la película *El planeta de los simios* que protagonizó Charlton Heston. Ante esta posibilidad, el Dr. Izpisua asegura que existen tecnologías para evitar que se formen neuronas humanas en el cerebro animal. Dice también el Dr. Izpisua que con su investigación no se pretende obtener embriones quiméricos con el propósito de lograr adultos



quiméricos animal-humano, sino simplemente, descubrir los procesos que facilitan la comunicación cruzada interespecífica entre las células durante el desarrollo de los embriones quiméricos, así como comprender mejor el desarrollo temprano humano y la evolución de los primates.

La Sociedad Internacional para la Investigación con Células Troncales (ISSCR) va a hacer públicas unas nuevas directrices revisadas. En 2015, los NIH de los Estados Unidos anunciaron una moratoria sobre la financiación con fondos federales de la investigación con embriones quiméricos animal-humano. Sin embargo, en 2016, se propuso levantar la suspensión restringiendo la prohibición a quimeras creadas después de la gastrulación, cuando empieza la formación del sistema nervioso. Más de cuatro años después, la prohibición sigue vigente.

Por su parte, Japón aprobó en 2019 los primeros experimentos con embriones quiméricos animal-humano. Como dicen los aforismos anteriormente citados, *"la Ciencia es imparable"* porque *"no se puede poner puertas al campo"* ya que *"todo lo que se pueda hacer, se hará"*. Recojo a continuación algunos comentarios recogidos en la prensa española:

El profesor Federico Montalvo, Presidente del Comité de Bioética de España, opina que "el objetivo actual es digno de aplauso, pero quizá habría que plantearse también si se puede utilizar para otros fines, como crear una especie de sujeto intermedio. El riesgo es abrir un camino que puedan recorrer otras personas". Se trata del peligro de la "pendiente resbaladiza" (*slippery slope*) con que tantas veces se argumenta en el debate bioético.

Carlos Romeo Casabona, catedrático de Derecho Penal en la Universidad del País Vasco, miembro del Comité de Bioética de España y único miembro español del Comité de Ética Científica que asesora a la Presidenta de la Comunidad Europea Ursula von der Leyen, no ve problema alguno en esta fase de investigación y diciendo que "no tengo reproche ético alguno y no hay base alguna para que estos experimentos deban estar perseguidos legalmente". Además, refiriéndose al "test del hámster" que se utilizaba en los años setenta del siglo pasado para evaluar la fertilidad masculina fecundando óvulos de hámster con espermatozoides humanos, decía que "se fecunda un animal con gametos humanos y nadie se escandalizaba". No es lo mismo, evidentemente, que la obtención de embriones quiméricos mono-humanos, pero como analogía puede sernos útil para reflexionar.

Manuel Serrano, investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRBB), opina que "científicamente no hay nada revolucionario en este trabajo porque quimeras humanas con ratón, cerdo vaca y mono ya se han hecho" aunque añade que

"hay una mejora técnica importante y esto tiene mérito científico". Desde el punto de vista ético de la investigación, el Dr. Serrano dice que "muchos investigadores están pidiendo que se amplíe el margen de los 14 días" y reconoce que "muchas veces la investigación va por delante de la regulación ética" aunque "los científicos queremos que haya regulaciones éticas, no queremos estar en un vacío legal" y finaliza asegurando que "estos embriones fracasan porque los macacos y los humanos no somos lo suficientemente próximos". La cuestión ética que queda en el aire es ¿y si la investigación se hace con alguno de los grandes simios: chimpancé, gorila u orangután?

Alfonso Martínez Arias, biólogo por la Universidad Complutense y actualmente en la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona después de haber estado muchos años en la Universidad de Cambridge, es muy crítico con el trabajo en cuestión: "era innecesario abrir la caja de Pandora" y considera esta investigación "de dudosa ética", añadiendo que "este tipo de experimentos puede generar miedos injustificados en la sociedad y poner en peligro el trabajo de otros científicos que están intentando crear un marco ético y legal para investigaciones relacionadas".

En mi opinión, aunque en el caso de la experimentación realizada por Izpisua y colaboradores no se trata, insisto una vez más, de embriones humanos quiméricos con células de mono sino de embriones de mono quiméricos con células humanas, no está de más recordar que la ley española 14/2006 sobre Técnicas de reproducción humana asistida considera infracciones muy graves "permitir el desarrollo in vitro de los preembriones más allá del límite de 14 días siguientes a la fecundación del ovocito, descontando de ese tiempo el que pudieran haber estado criopreservados". Por guardar cierta analogía, podemos señalar que, en el caso que nos ocupa, los embriones de mono quiméricos llegaron a ser cultivados ex vivo hasta los 19 y 20 días. También la ley 14/2006 considera infracción muy grave "la práctica de cualquier técnica no incluida en el anexo ni autorizada como técnica experimental en los términos previstos en el artículo 2" por lo que la producción de quimeras que incluyan material genético humano queda prohibido.

Por otro lado, la ley 14/2007 de Investigación biomédica, en su artículo 33, apartado 1, "prohíbe la constitución de preembriones y embriones humanos exclusivamente con fines de experimentación".

Como he señalado anteriormente, una de las instituciones implicadas en esta investigación es la Universidad Católica San Antonio de Murcia (España) que es una universidad privada fundada en 1996 por José Luis Mendoza Pérez y propiedad de la Fundación Universitaria San Antonio. Fue erigida canónicamente en 1996 de

conformidad con el artículo 3.3 de la Constitución Apostólica *Ex Corde Ecclesiae* del papa Juan Pablo II de 15 de agosto de 1990. Investigadores de esta universidad participaron previamente en trabajos sobre *quimeras* cerdo-humano. Sin deseo alguno de polemizar, me llama la atención la participación de esta universidad en un tema de investigación tan comprometido éticamente como puede ser el de los embriones quiméricos macaco-humano.

3. REFERENCIAS

1. Subbaraman N. First monkey-human embryos reignite debate over hybrid animals. *Nature News* 2021; (15 april 2021).
2. Tan T, Wu J, Si Ch, Dai S, Zhang Y, Sun N, Zhang E, Shao H, Si, W, Yang P, Wang H, Chen Z, Zhu R, Kang Y, Hernández-Benítez R, Martínez Martínez LI, Núñez Delicado E, Travis Berggren W, Schwarz M, Ai Z, Li T, Rodríguez Esteban C, Ji W, E Izpisua Belmonte JC. Chimeric contribution of human extended pluripotent stem cells to monkey embryos ex vivo. *Cell* 2021; 184: 2020-2032.
3. Ma H, Zhai J, Wan H, Jiang X, Wang X, Wang I, Xiang Y, He X, Zhao Z.A, Zhao B, et al. *In vitro* cultura of cynomologus monkey embryos beyond early gastrulation. *Science* 2021; 366, eaax7890.
4. Niu Y, Sun N, Li C, Lei, Y, Huang Z, Wu J, Si C, Dai X, Liu C, Wei J.,et al. Dissecting primate early post-implantation development using long-term *in vitro* embryo cultura. *Science* 2019; 366, eaaw5754.
5. Wu J, Greely HT, Jaenish R, Nakauchi H, Rossant J, E Belmonte JC. Stem cells and interspecies chimeras. *Nature* 2016; 540: 51-59.
6. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia, M, Izpisua Belmonte, JC. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 2017; 168: 473-486.
7. Aksoy I, . . . Serrano M, Afanassif M, Savatier P. Primate naïve pluripotent stem cells stall in the G1 phase of the cell cycle and differentiate prematurely during embryo colonization. *Stem Cell Reports* 2020; doi: 10.1016/j.stemcr.2020.12.004.
8. Lacadena JR. Bioética y Ciencia. En: *Pasado, presente y futuro de la Bioética española* (Javier de la Torre, Ed.) Universidad Pontificia Comillas, Madrid. 2011; pp. 205-231.

DECADENCIA DEL ARTE CLÍNICO Y AUGE DE LA MEDICINA TECNOLÓGICA

DECLINE OF CLINICAL ART AND TECHNOLOGICAL MEDICINE BOOM

José Antonio Rodríguez Montes

Catedrático de Cirugía. Profesor Emérito de la UAM. Académico Correspondiente de la RANF

corresponding author: ja.rodriguezmontes@uam.es

COMENTARIO

RESUMEN

En la actualidad existe consenso en que el arte clínico se ha ido deteriorando durante los últimos 50 años. Este problema ha suscitado atención internacional mediante el incremento de publicaciones, cursos, symposia y congresos. El menoscabo de la docencia a la cabecera del paciente y el consecuente declive de las habilidades clínicas tienen diversas causas; en particular, el uso abusivo e inadecuado de las nuevas tecnologías. En consecuencia, se hace difícil si no imposible obtener una recopilación apropiada de los síntomas padecidos por el enfermo. Junto con la anamnesis, la exploración física es preceptiva para el correcto diagnóstico y prescripción del tratamiento oportuno.

En este artículo se exponen las causas de la decadencia del arte clínico y cómo recuperar el ancestral patrimonio de la práctica médica.

ABSTRACT

Currently there is a consensus that the clinical art have been greatly deteriorating during the past 50 years. This problem has raised worldwide attention through as increase in publications, courses, symposia and congress. The erosion of bedside teaching and the consequent decline of clinical skills, notably wrongfull and inadequate use of new technologies. At as result, it becomes difficult if not impossible obtain an appropriate collection of the syntoms sufferick for the sick. Together with the medical history, the physical examination is mandatory for the correct diagnosis and developing the treatment plan.

In this paper, the decline of clinical art is exposed and how this ancient heritage of medical practice can be recovered.

Palabras Clave:

Arte clínico
Habilidades clínicas
Medicina tecnológica

Keywords:

Clinical art
Clinical skills
Technological medicine



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años, el extraordinario progreso alcanzado por la ciencia y tecnología médicas, los métodos diagnósticos y los recursos terapéuticos, han posibilitado atenuar las consecuencias de la enfermedad, mejorando e incrementando la calidad de vida del ser humano. Sin embargo, estos avances han generado no solo cambios en la asistencia del paciente sino que han llevado a la pérdida del liderazgo del médico clínico y al deterioro significativo de la relación médico-paciente, esencia del acto médico y patrimonio de la práctica médica desde Hipócrates. Ya en 1959, Snow (1) en una *Rede Lecture* celebrada en la Universidad de Cambridge (Inglaterra) llamó la atención sobre el cisma entre ciencia y arte en la medicina.

El adecuado equilibrio al aplicar "ciencia" y "arte" es requisito indispensable para el éxito de la práctica médica. No es cuestionable el relevante papel de la ciencia en la génesis de los nuevos conocimientos y recursos tecnológicos, pero es obvio que el solo uso de la ciencia no hace al buen médico. Es el "arte" en la comprensión y gestión de los aspectos humanitarios, más que la ciencia, lo que facilita la proximidad al enfermo, que en situación ideal se hace posible por los atributos humanísticos del médico de integridad, respeto y compasión (2). Sin embargo, en opinión compartida por pacientes, familiares y profesionales sanitarios, en la actualidad, los médicos muestran menor interés por los saberes y habilidades relacionados con la comunicación, la empatía y los aspectos psicosociales requeridos en la asistencia de los enfermos y, por ello, en algunos ámbitos, existe un justificado interés y preocupación por recuperar nuestro ancestral profesionalismo (3,4). El indudable beneficio de la ciencia médica puede transformarse en bumerán si ciencia y tecnología no son aplicadas considerando la condición humana del paciente, al que siempre debe tratarse respetando su dignidad y escala de valores y reconociéndole su libertad para elegir y actuar. La medicina desde sus orígenes ha sido un quehacer humanístico centrado en el paciente, siguiendo la conocida máxima *donde quiera que se quiera el arte de la medicina, hay también amor a la humanidad*.

Platón, en Fedro 237-b, escribió: *Cualquiera que sea el asunto, solo hay un principio posible si se quiere deliberar bien: hay que saber lo que es aquello sobre lo cual se trata o forzosamente se yerra en todo*. Por ello, de acuerdo con su afirmación, al exponer el tema objeto de esta conferencia, es conveniente contestar a las preguntas: qué es la Medicina clínica y qué se entiende por arte clínico.

2. ¿QUÉ ES LA MEDICINA CLÍNICA?

La Medicina Clínica es un saber práctico (Arte) con fundamento científico (Ciencia) al servicio del ser humano (Humanismo) (5). Esta definición solo cubre parcialmente el concepto global de la Medicina y su relación con la salud (Epidemiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Patología Humana), pero en esta exposición solo nos referiremos a la Medicina Clínica, aquella que se ejerce en relación directa con el paciente y solo tiene sentido si está a su servicio. Se puede entender la medicina clínica como la interacción de los tres aspectos mencionados: arte, ciencia y humanismo. Durante la práctica clínica, estas tres facetas de nuestra actividad experimentan una interacción constante y positiva que las suma y potencia, las cuales deben mantener un equilibrio adecuado. De hecho, el acto médico más simple y rutinario contiene siempre elementos de las tres.

La medicina es arte y ciencia. Por diversas razones, existe una tendencia cada vez mayor a considerar "técnico" al médico, ignorando lo que la medicina tiene de arte. En el primer aforismo de Hipócrates, *vita breve, ars longa, occasio praeceps, experimentum periculosum, iudicium difficile* (la vida es breve, el arte largo, la ocasión fugaz, la experiencia peligrosa, el juicio difícil), se hace referencia a la medicina como un arte, lo que en aquel entonces era sinónimo de "práctica", de una actividad dirigida a modificar el curso de los acontecimientos humanos por una parte, y por otra a crear conocimiento. En el citado aforismo, Hipócrates expone las dificultades de toda disciplina práctica más allá de la medicina; indirectamente, se refiere al proceso de producción de conocimientos y a las trabas para encontrar una única verdad, lo que continúa vigente.

La ciencia es un cúmulo de conocimientos ciertos de las cosas por sus principios y causas y, a la vez, un cuerpo de doctrina, metódicamente formado y ordenado, que constituye una rama concreta del saber humano, en nuestro caso, de la Medicina. El arte es la virtud o habilidad del hombre para "hacer alguna cosa", la facultad o "el acto" por los que el individuo utilizando la materia, la imagen o el sonido, imita o expresa lo material e inmaterial ya sea a través de la copia o de la fantasía. La Medicina como cuerpo de doctrina de los conocimientos médicos es una ciencia.

Arte y técnica no son sinónimos, si bien tienen un origen común. Técnica (del griego *tékhnē*), es el conjunto de procedimientos y recursos de que se sirve una ciencia, arte u oficio. Arte (del latín *ars, artis*) es definido como conjunto de preceptos y reglas para hacer bien algo; con un resultado más práctico que teórico, aunque por antonomasia se aplique a toda actividad humana dedicada a la creación de cosas bellas. Hace más de dos mil años, ambos términos aludían a lo mismo: a un proceso creativo basado en determinados "saberes", en su mayoría empíricos, independientemente



de si se buscara un fin estético o un fin utilitario. En el devenir histórico se produce una separación en el significado de las palabras que diferencia "arte" de "técnica". En la actualidad, al arte se le atribuye un sentido estético y a la técnica un sentido utilitario y el carácter de brazo ejecutor de la ciencia.

La medicina es más que una técnica, es básicamente un arte, no porque su actividad se destine a un objetivo estético (no pertenece al área de las bellas artes), sino por su objetivo humano, que es el prójimo con toda su complejidad. La medicina es un puente tendido hacia el hombre enfermo para mejorar su condición. Mejorar la salud humana requiere en primer lugar que se tenga por finalidad dignificar al paciente como persona, cuya particularidad vital es estar enfermo, débil (*in firmus*, no firme). El médico siempre está en superioridad de condiciones ante la debilidad del enfermo; no existe igualdad en la relación médico-paciente, tan pretendida por el anhelo iconoclasta moderno (6). Es la capacidad de "dar" lo que hace de la medicina una noble profesión; de ponerse en el lugar del paciente para poder ayudarlo. El arte, a diferencia de la técnica, es creativo, en el que participa la intuición, lo empírico, además de otros saberes distintos del saber científico, y sobre todo proyección individual. Por ello, la medicina ha sido y es un arte por el que dos médicos no actúan de la misma forma frente al mismo enfermo.

La medicina se fundamenta en la ciencia, que tiene que probar y demostrar, que es exacta e indudable, y no tiene sensaciones. El arte expresa emociones y sentimientos, es extenso y no tiene límites. El científico debe ser preciso e inequívoco, en cambio, el artista se desenvuelve con total libertad y confiere a su obra un estilo. Existe una ciencia médica; sin embargo, la práctica médica, la aplicación del conocimiento científico al enfermo, requiere del arte médico como medio y estímulo para su menester. Hacerla solo dependiente de la ciencia y tecnología es equiparable a cualquier otra teoría o práctica tecnológica. Considerarla solo arte, es priorizar su característica fundamental, su vocación tradicional de ayuda y cuidado. Por ello, cuando el médico recurre a la ciencia y a la tecnología debe aplicarlas en el contexto adecuado, acorde con la base filosófica subyacente del arte clínico. William Osler (1849-1919), el padre de la Medicina moderna, reconoció que *los llamados humanistas no tienen suficiente ciencia y la ciencia carece tristemente de humanismo y añadió este desgraciado divorcio nunca debería producirse*, una sentencia que debería ser atendida por los clínicos y docentes.

Los términos "arte" y "ciencia" de la medicina no son utilizados para señalar una diferencia cuantitativa sino para indicar la posibilidad y necesidad de mirar y ver a los pacientes desde dos puntos de vista totalmente distintos: desde la ciencia, que juzga basada en mediciones, y el "arte" que indica la actitud del clínico frente a la Naturaleza y al paciente, que es muy similar a la del artista ante la Naturaleza y su creación.

En medicina, desde el momento en que se trata de la puesta en práctica del saber que el hombre posee y utiliza sobre sus iguales, el acto médico trasciende la aplicación de conocimiento científico. Surge en ese acto una relación interpersonal en la que se crea el clima terapéutico, elemento esencial para lograr una medicina competente. Es precisamente en la génesis de ese clima, en esa relación, donde se establece el componente artístico del acto médico.

3. ¿QUÉ ES EL ARTE CLÍNICO?

En los primeros escritos griegos se designa la medicina como *téchne iatriké*, una técnica especial que se transmitió al mundo romano a través de la palabra *ars* (*ars medica* o *ars clinica*) que siempre se ha traducido como arte. Ya en el siglo V a.C. en un texto atribuido al sofista Protágoras de Abdera (485-411 a.C.) titulado *Sobre el arte*, se hacía apología de la medicina como profesión y ciencia práctica. También se atribuye a Dungalo, monje de la escuela palatina de Aquitania, en la Alta Edad Media, (siglos V-IX y X) haber sido el primero que propuso la incorporación de la Medicina como la octava entre las artes liberales y entre ellas se ha encontrado hasta hoy y se ha admitido así como expresión de que no puede reducirse a leyes y normas generales como ocurriría de ser una ciencia (7). Por ello, en el siglo XX, especialmente se ha mantenido la dialéctica arte-ciencia, particularmente impulsada por quienes le han negado el carácter científico a una ocupación que es, sobre todo, *ars operandi*, es decir, aplicación de conocimiento a la anamnesis, exploración física, diagnóstico y terapéutica, que se engloba dentro de una práctica que se denomina arte clínico.

La Medicina no se incorporó al desarrollo científico moderno iniciado por Galileo (1564-1642) y Descartes (1596-1650) hasta el siglo XIX con la aparición del positivismo, en el que se preconiza una metodología médica sistemática. Friedrich Osterlen lo intenta en su obra *Medizinische Logik* (Heidelberg, 1852) aplicando los principios de Bacon y John Stuart Mill a la clínica; después aparecen dos obras básicas de Claude Bernard: *Introducción al estudio de la Medicina experimental* (1887) y *Principios de Medicina experimental* (obra descubierta y publicada póstumamente por Leon Delhoume en 1947). Claude Bernard aspiró a sentar las bases de una medicina científica, propugnando una metodología que tenía mucho de la metodología de las ciencias naturales, distinguiendo dos estadios científicos de la Medicina:

1) La Medicina de observación, y 2) La Medicina experimental. La medicina de observación contempla; la medicina experimental actúa. La primera nace con Hipócrates; la segunda, tiene por objeto actuar sobre el organismo, apoyándose en la experimentación.



En las últimas décadas, el viejo arte de curar se ha fundido con la joven ciencia de la medicina. Y se entiende aquí por arte de curar el aliviar, con destreza e inventiva, al enfermo de cuerpo o de espíritu. Como todas las artes, ésta solo puede medirse por la inspiración que suscita. Por el contrario, la ciencia médica abarca todos los valiosos y demostrables resultados de la aplicación de las facultades intelectuales del hombre a los problemas relacionados con la salud. El arte de curar es tan viejo como la historia, mientras que la ciencia médica es relativamente joven, y hasta los últimos tiempos no se ha valido por sí misma.

La práctica clínica -siempre heterogénea- es el proceso de actuación médica relacionada con la atención a la salud del paciente. Sus componentes son la información clínica obtenida, las percepciones, los razonamientos, los juicios, los procedimientos utilizados, las decisiones y las intervenciones que se realicen (8). Se basa en gestos originales y diferentes que requieren capacidad de síntesis, capacidad para descubrir e interpretar signos y síntomas, humildad, tiempo y paciencia, inteligencia para jerarquizar los distintos elementos y sentido común. Por todo esto, para un mismo enfermo, las soluciones que plantean distintos médicos pueden ser diferentes ya que no todos los médicos tienen igual aptitud ni talento para procurar "salud".

El médico es clínico, porque además de colocarse atentamente frente al enfermo, sabe hacer bien un conjunto de gestos artesanales, por los que se establece una relación necesaria: la relación médico-paciente, sin la cual falta lo nuclear de la actividad asistencial. La medicina práctica, o arte clínico, es cosa de saber hacer, bien. Cuando se dice que la medicina es un arte, se está considerando la acepción de que arte es un conjunto de reglas para ejecutar bien algo.

El arte clínico es saber utilizar los conocimientos en favor del enfermo. El arte clínico consiste en hacer bien una serie de acciones indispensables para obtener la curación del paciente cuando ello es posible, el máximo alivio cuando la curación no puede alcanzarse y el máximo consuelo si no podemos aliviar, haciendo realidad el conocido aforismo *Cura a veces, trata con frecuencia, consuela siempre*.

El arte clínico es el estilo de los gestos y procedimientos que el médico realiza para obtener el diagnóstico. Es el modo de realizar la recogida de datos, signos y síntomas mediante técnicas que van desde la anamnesis hasta maniobras instrumentales; es obra de artesanía y, como la artesanía, exige tiempo, esfuerzo, imaginación y oficio.

El arte clínico es expresión de humildad. El adjetivo griego *Klinikós*, deriva de *Klino*, cuya raíz *Kli*, significa inclinarse. *Klinikós*, es, en sentido etimológico aquel que se inclina para observar. Se podría, pues, traducir el *yatrós klinikós* helénico, como el médico que se inclina para examinar al paciente, reclinado a su vez en el lecho o *kliné* (8).

De la etimología, puede deducirse la interpretación que cuando el médico se inclina, ante el enfermo encamado, da testimonio de interés, ciencia y humildad; testimonio que clásicamente han reflejado los pintores, al retratar al médico como profesional atento e inclinado. Recordemos, por ejemplo, los cuadros *Ciencia y Caridad* (Pablo Ruiz Picasso, 1897), *The doctor* (Sir Luke Fildes, 1891), *Visita al hospital* (Luis Jiménez Asúa, 1897) y *Vacunación de niños* (Vicente Borrá y Abella, 1898), entre otros muchos.

El arte clínico ofrece tres características: pervivencia (que le confiere actualidad); eficacia (que le da pragmatismo) y veracidad (que le otorga validez), además de otras que por afectar a la forma o estilo del hecho o documento podrían considerarse como formales (por ejemplo, las ilustraciones de Jan Calcar en *La Fábrica*, de Vesalio, o las del muy conocido *Atlas de Anatomía Netter*). Así, mientras que el saber doctrinal que constituye la ciencia médica es históricamente relativo (Rof Carbayo), a la época en que se publica, cambia con los tiempos, y periclita, cuando el avance de la Medicina descubre nuevos hechos y otras ideas, el arte clínico, salvando las lógicas distancias, se basa en los mismos principios que, en los albores de la Medicina, permitieron una precisión exploratoria fascinante, sin que esto quiera afirmar que en la actualidad siga siendo válido el saber médico hipocrático. Tal era la capacidad de observación y certeza que tras varios siglos después, si el médico de hoy lee al azar cualquiera de las historias clínicas contenidas en el *Tratado de las Epidemias* de Hipócrates, identificaría sin ninguna dificultad, la fiebre del filósofo Hermógenes, discípulo de Sócrates, o la de Charión, el que se alojaba en casa de Demanetus, o la fiebre puerperal de la mujer de Ocete (8).

4. RELACIÓN MÉDICO-PACIENTE

El acto médico es un ejercicio de humanismo, entendido también como humanitarismo, que se basa en una insustituible relación de confianza mutua entre el médico y su paciente, cuyos aspectos físicos y espirituales deben ser individualmente considerados y atendidos.

La relación médico-paciente es un vínculo interpersonal y complejo, en el que participan elementos psicológicos conscientes e inconscientes que, bien gestionados por el médico y el paciente, hacen posible una relación sólida, indispensable e irrenunciable para la atención médica. Este vínculo está caracterizado por las percepciones que cada participante tiene del otro, en lo que concierne a motivaciones, intereses, capacidad para la comprensión y para relacionarse. La deficiencia del médico para establecer una buena relación con el paciente, explica buena parte de los fracasos en la asistencia médica. Las diferencias culturales, sociales o intelectuales pueden interferir en gran medida en este vínculo (2,4).

La ayuda es la esencia de la diada entre médico y paciente. Su aplicación constituye la realidad de la Medicina. Varios pueden ser los motivos que estimulan en el médico su actitud de ayuda ante el enfermo, pero el sustrato que soporta la voluntad de ayuda del médico se llama filantropía. Ahondando en el corazón del hombre, Hipócrates encontró su sentimiento más elevado: la filantropía, el amor al prójimo como semejante, y dejó constancia en sus *Precepta* que en la filantropía estaba básicamente la esencia de su afectividad por el paciente.

En el marco de una vinculación cognitiva y afectiva se estructura la relación médico-paciente en cuatro estadios principales: la confianza, la confidencia, la condolencia y la concordancia. Lo primero que el paciente establece con el médico es la confianza que el primero pone en el segundo. Entregada esta confianza, se realiza verbalmente la confidencia; es decir, la comunicación que de su dolencia o problema hace el paciente al médico de forma reservada. Mediante el relato confidencial del enfermo, el médico conoce su problema y con mayor o menor intensidad, según los casos, lo siente afectivamente. Surge un aspecto esencial de la relación médico-paciente, la condolencia, la participación del primero en el sufrimiento del segundo, como un sentimiento empático. Siendo condoliente el médico con la patología del paciente se establece la concordancia de objetivos entre ambos, que, en términos generales, se refiere a la restauración de la salud. Completada esta relación, el médico hace entrega al enfermo de sus dos cualidades más valiosas: la benevolencia y la beneficencia; es decir, el deseo del bien para el paciente e intentar hacerlo realidad (9).

Si la confianza es, de los componentes de la relación médico-paciente, el más propio del enfermo, la condolencia es la aportación más importante que hace el médico a esa relación, constituyendo su núcleo moral. El médico, manteniendo su realidad personal, se une vivencialmente con el enfermo y cada uno, a su modo, vive la misma vivencia de enfermedad. No puede, obviamente, el médico compartir la sintomatología del paciente porque ésta es del paciente y solo suya, pero puede conocerla y llegar a sentirla o sentirla primero y después conocerla (9).

5. EL DIAGNÓSTICO

El objetivo inmediato del arte clínico es conocer. Para el paciente, conocer es saber la importancia de su patología y las posibilidades de curación. Para el médico, conocer es denominar, pronosticar y curar la enfermedad.

Se entiende por diagnóstico al conjunto de signos que sirven para fijar el carácter peculiar de una enfermedad y también es la calificación que da el médico a la misma, según los signos que advierte. Para ello, el clínico utiliza la propedéutica y la semiología.

La enfermedad exige del médico que la identifique, es decir, su diagnóstico. Antes del diagnóstico no existe la enfermedad, a lo sumo, síntomas y signos; solo cuando el médico ha valorado el conjunto de éstos, la dolencia es concretada con su nombre y a veces con sus apellidos.

El diagnóstico es un proceso mental, que en primer lugar diferencia el estado normal del patológico, y después, una vez confirmada la dolencia, establece la causa, la naturaleza y el lugar de la misma. Además de un elemento de causalidad, el diagnóstico lleva implícito un doble proceso sintético-analítico que, sustentado por los conocimientos y la experiencia, se basa en la recogida de datos, síntomas y signos, mediante técnicas que van desde la anamnesis, hasta procedimientos manuales e instrumentales. Después viene la elaboración lógica, el cribado de los datos obtenidos en la exploración física.

El diagnóstico, tiene además de lógica, una ética, ya que de su confirmación o rechazo depende el futuro vital del paciente. Debe considerarse, un acto más, en la sucesión de hechos que constituyen el arte clínico. Emitir un diagnóstico exige madurez y ponderación, difundirlo requiere responsabilidad y sentido moral. A pesar de los grandes avances del siglo XX, el médico comete los mismos errores en la anamnesis y exploración física de antaño, y otros más provocados por la profusión de la tecnología diagnóstica: tiempo insuficiente para la consulta, anamnesis incompleta, exploración incompleta o defectuosa, errores de juicio (temprano, de omisión) y premura en solicitar análisis y pruebas diagnósticas, falta de atención a los problemas psicológicos del paciente (10).

6. OJO CLÍNICO

El médico actual ha perdido otra cualidad que los profanos admiraban: el ojo clínico. Entre las dos cualidades básicas exigibles al clínico (capacidad de descripción y capacidad de observación) saber observar es la más importante. El ojo clínico es una cualidad subjetiva, muy ligada al arte del diagnóstico; es la resultante de tres componentes imprescindibles: sólidos conocimientos, larga experiencia y talento personal. Este último aspecto concierne a la subjetividad y es lo que determina que un médico estudioso lo posea y otro, también estudioso y experimentado, carezca de él.

El ojo clínico es un atributo fisiológico e intelectual. El médico que no sabe ver enfermos es muy difícil que llegue a reconocer las enfermedades. Buen clínico es ante todo, quien frente a un enfermo sabe ver y sabe interpretar.

El término que mejor define el grado de capacidad de un médico para el ejercicio profesional es el de "pericia clínica" (11), que los anglosajones denominan *expertise*. La pericia clínica (mucho mejor que el ojo clínico) permite al médico establecer un buen juicio



clínico, entendido como un proceso de toma de decisiones en ausencia de leyes o reglas explícitas. El poder deductivo asociado a la pericia clínica no se basa solo en la experiencia, sino también en la observación y el estudio, el rigor en la obtención de datos y el sentido común. El grado máximo de la pericia clínica se sitúa en el último de los cinco escalones de la escala de nivel de Dreyfus (novel, principiante avanzado, competente, diestro y experto), caracterizado por la captación intuitiva y profunda de las situaciones, por la no utilización de reglas, normas ni protocolos, por el inicio de procesos analíticos solo ante situaciones nuevas y por una visión rápida de aquello que es posible (11).

7. EL MÉTODO CLÍNICO

Método es el camino (*odòs*) para alcanzar una meta. Método clínico será el camino que sigue el clínico para llegar al diagnóstico y tratamiento de un paciente. El método científico, es el método más exacto, y se atiene a las leyes que rigen los fenómenos científicos.

El método clínico es el proceso sistemático que todo médico debe aplicar en la búsqueda del diagnóstico definitivo, con un umbral de certeza adecuado. La relevancia del método clínico, como proceso del diagnóstico inherente a la medicina práctica, radica en que el objetivo de la asistencia a la persona enferma es la curación y para lograrlo se requiere descubrir el diagnóstico correcto y prescribir el tratamiento oportuno para la patología que presenta el paciente. El método clínico no solo requiere conocimientos médicos sino también de todos los factores asociados al paciente en su contexto biopsicosocial (12). Al involucrar factores del paciente y su entorno, el método clínico se transforma en un juego probabilístico, evita las aproximaciones gestálticas o heurística (13). Este proceso diagnóstico mantiene las técnicas utilizadas para obtener la confirmación de una hipótesis, mediante la anamnesis, la exploración física y el razonamiento o juicio clínico (14). Al ser un proceso sistemático, metódico, evita que el médico emita afirmaciones basadas en el sentido común o premisas falsas que, aunque en ocasiones pueden coincidir con la enfermedad, no es la norma.

El método clínico puede aportar hasta el 95% del diagnóstico. Es así que mediante la anamnesis se puede llegar al 60-70% del diagnóstico, la exploración física suma un 10-15% y las pruebas complementarias pueden aumentar esta certeza diagnóstica hasta el 95% (13,14). Consta de cinco etapas: la primera, es la identificación del problema; el paciente sufre una alteración que motiva acudir al médico (14), motivación que siempre debe ser valorada. La segunda, consiste en la búsqueda de información que lleve a la resolución del problema; esta información se obtiene mediante la anamnesis y la exploración física. Durante el interrogatorio

se deben evaluar cuáles datos de los analizados son importantes y cuáles deben ser investigados con mayor profundidad. La exploración física proporciona la evidencia confirmatoria a favor de una o más posibilidades diagnósticas, por lo que más que una exploración rutinaria, debe ser una exploración general, pero orientada a confirmar o eliminar las hipótesis diagnósticas sospechadas. No es solo la técnica la que determina el éxito para detectar hallazgos patológicos en la exploración física sino una mente preparada para captarlos. A pesar del valor que tiene la adecuada exploración física, las habilidades que exige y el tiempo requerido para dominar su práctica, recoger la anamnesis es el primero y más importante proceder, a tal extremo que en opinión de los expertos nunca se aprecia mejor la experiencia clínica, la ciencia, la incursión psicológica y la autoridad moral de un médico que cuando se le escucha mientras interroga (15). En la tercera etapa, con toda la información recogida, se debería tener una impresión diagnóstica, diagnóstico de presunción o hipótesis formulada, que debería estar basada en los datos recogidos y tener un soporte teórico. Esta hipótesis diagnóstica es importante porque genera las acciones futuras que llevarán a la resolución del problema. La cuarta etapa consiste en contrastar el diagnóstico de presunción mediante la solicitud de manera enfocada y razonada de diversas pruebas diagnósticas complementarias; pruebas que son importantes porque reducen el área de incertidumbre. La última etapa estriba en la confirmación o negación de las hipótesis planteadas tras la ejecución de las pruebas complementarias, aunque debe resaltarse que no siempre hay que efectuarlos para obtener el diagnóstico definitivo.

8. OCASO DEL ARTE CLÍNICO EN LA MEDICINA ACTUAL

Existe consenso en que el arte clínico se ha ido deteriorando durante los últimos treinta años, aunque algunos informes al respecto datan de la década de los años 70. Este problema ha ganado atención internacional mediante el aumento de publicaciones, cursos, symposia y congresos al respecto. La docencia a la cabecera del paciente ha sido la modalidad ideal de aprendizaje clínico. En la que el estilo de hacer la anamnesis y las habilidades en la exploración física pueden ser demostradas junto a la actitud y buen hacer profesional. El deterioro de esta modalidad de docencia y el consecuente declive de las habilidades clínicas tienen diversas causas; en particular, el uso abusivo e inadecuado de las nuevas tecnologías. Como resultado, se hace difícil sino imposible obtener una recogida exacta de los síntomas experimentados por el paciente. Junto con la anamnesis, la exploración física es determinante para el correcto diagnóstico y prescripción del tratamiento oportuno.

Ya en 1962, el traumatólogo Rafael de Vega publicó un ensayo clínico titulado *Grandeza y menosprecio del arte clínico*, en



el que planteaba un serio problema profesional: *Desde hace unos lustros cualquier observador se percata, que los médicos, en proporción creciente, interrogan mal, exploran mal y, en consecuencia, yerran sus diagnósticos y tratamientos* (16). La situación ha seguido deteriorándose, de tal modo que el arte clínico que siempre ha sido consuetudinario del quehacer médico, corre ahora el riesgo de ser sustituido por la técnica y el pragmatismo al adoptar el médico actitudes que le alejan de sus responsabilidades con los pacientes y la sociedad.

En efecto, en las últimas décadas, la educación médica ha asumido una progresiva tecnificación de las destrezas exigidas para el ejercicio profesional. Sin que esto sea, por sí mismo, un demérito o algo negativo, esta evolución evidencia un desplazamiento de las habilidades clínicas basadas en la palabra y en la exploración física (8,13,15-20); no obstante, sería injusto no reconocer o ignorar los extraordinarios progresos que la tecnología dedicada al servicio de la salud ha permitido alcanzar. No se trata, pues, de oponer tecnología a la relación médico-paciente, ya que no es la separación sino la conjunción de las habilidades con la tecnología la llave del progreso médico. Hablar de arte en medicina no es una apostasía de la ciencia.

La ciencia y las nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas que de ella derivan están modificando de manera radical el modo con el que se ejerce la medicina. Mucho de lo que practicamos en la medicina no tiene base científica e, incluso, lo que la tiene, requiere la aplicación del juicio clínico para decidir cuándo y cómo elegir entre las diferentes opciones disponibles. La experiencia está siendo desacreditada siguiendo la tendencia social dominante que solo valora lo nuevo. *Se olvida que el conocimiento es experiencia, todo lo demás es información* (Einstein).

Aunque el péndulo de la medicina está desplazándose del arte de la medicina hacia su perfil científico, el mejor clínico es tal vez aquel que provisto de sólidos conocimientos médicos atiende al paciente dotado de un equilibrado juicio clínico; es decir, aplica su arte, del que forman parte no solo el juicio clínico sino la condolencia y la compasión (21). Escuchar, hablar, siguen siendo gestos esenciales de la práctica médica. Su propia persona sigue siendo el principal recurso con el que cuenta el médico (22).

Los médicos actuales parecen estar demasiado entrenados en la ciencia pero poco preparados en lo que respecta a las habilidades sociales y para relacionarse con sus pacientes como seres humanos. En este sentido, la conocida aseveración del gran clínico francés Trousseau *"el peor hombre de ciencia es aquel que nunca es un artista"* puede aplicarse al médico moderno que exuda ciencia pero carece del arte de la medicina. Ayudar a los enfermos a sanar es puro y simple arte, aunque el médico es, no obstante, un "artista" peculiar ya que, necesariamente, debe poseer sólidos conocimientos científicos.

La profesión médica hoy día no solo tiene problemas de diversa índole, sino que, además, tiene una "enfermedad" que se inicia en las facultades de Medicina, donde no siempre se le dedica la atención que merece y requiere, y de la que los docentes son los únicos responsables. Durante el período de Residencia es fácil de reconocer, pero no se hacen los esfuerzos para evitarla y en el mejor de los casos las medidas correctoras son inadecuadas, ignoradas o atemporales.

Esta "enfermedad" ha sido denominada por Herbert Leonard Fred (1929-2018), reputado clínico norteamericano, "deficiencia de habilidades clínicas" (23), por la que, por definición, los afectados están mal o poco entrenados para asistir bien a los pacientes. Y los programas de Residentes aprueban un número cada vez mayor de estos "hipohábiles"; médicos denominados así porque no saben hacer una correcta historia clínica, ni una exploración física fiable, ni interpretar la información que recogen; tienen poco poder de razonamiento y escasa capacidad de comunicación con el enfermo; sin embargo, estos médicos son ávidos en pedir todo tipo de análisis y pruebas de imagen, aunque no siempre saben cuándo hay que solicitarlas ni cómo interpretarlas; se remiten a una suerte de "clinimetría" donde es más fácil ponerle número y *score* a los síntomas y signos que cualidades, como si con ello pudieran definir una constante absoluta sobre una patología; también han aprendido a valorar un cúmulo de datos más que al paciente a quien pertenecen, muchas veces sin tener presente que la petición de pruebas complementarias innecesarias conlleva un coste extra para el erario público o para el paciente, expone a éste a complicaciones e iatrogenias, ansiedad y pérdida de tiempo para él y sus familiares. En estas circunstancias, hay enfermos que pueden sentir desinterés, falta de empatía con su médico, sentirse ansiosos, ignorados e incumplir el tratamiento, aunque éste sea el correcto, mientras que el médico puede perder la capacidad de comunicarse, transmitir interés, confianza y esperanza.

Por esta actitud, adquieren, de modo inevitable e involuntario, una perspectiva enfocada al laboratorio y a la imagen más que al enfermo; tanto es así, que la consecución del diagnóstico está actualmente condicionada por la necesidad de objetivar con cifras e imágenes la impresión inicial. Esta preferencia por resolver las dudas mediante la objetivación es una estrategia no solo tranquilizadora como posible medio de defensa (medicina defensiva) sino que está imbuida del concepto de lo "científico"; por ello, es fácil constatar que muchos médicos tienen como prioridad verificar las hipótesis a través de la contundencia tecnológica de la imagen en ausencia de una anamnesis y exploración física pertinentes y correctas. Es obvio recordar que por ser la enfermedad un fenómeno del ser humano debería incluir, más que ignorar, la parte de incertidumbre intrínseca de todo proceso biológico o social que afecte al hombre.



Esta forma de ejercer la medicina ha despersonalizado la relación médico-paciente y, básicamente, ha eliminado el individualismo de la atención médica. A esta perniciosa práctica se le ha sumado un nuevo fenómeno denominado "tenesmo tecnológico": la incontrolable urgencia en demandar las pruebas tecnológicas más avanzadas. Esta conducta no solo es insidiosa y muy adictiva sino arriesgada para todos los médicos en su quehacer, particularmente para aquellos que están mal informados, mal entrenados y buscan "atajos" o caminos más cortos para obtener el diagnóstico (24).

En ocasiones, la clínica nos aporta ejemplos en los que la sustitución del juicio clínico por los exámenes complementarios puede ser una conducta peligrosa; desde el angor inestable al infarto de miocardio, los cuadros clínicos se asocian, en porcentajes importantes, con períodos de "silencio" bioquímico o electrocardiográfico mientras "se expresa" la clínica. Mientras dura esta situación (que en general se modifica en el curso de las horas), existe el riesgo de descartar el proceso ante la ausencia de datos "objetivos", sin valorar que es un momento arriesgado para el enfermo al privarle de observación y eventuales opciones terapéuticas, más resolutivas cuanto más tempranamente se apliquen.

La sustitución del juicio clínico y del abordaje cualitativo de la anamnesis por un criterio basado en la imagen o en los datos de laboratorio son desviaciones inaceptables. La empatía junto con la exploración física bien hecha y la interpretación correcta son el fundamento de la clínica eficaz.

El primer acto válido para adentrarse en la intimidad del paciente es la anamnesis, *el más poderoso, sensible y versátil medio disponible para el médico* (25); si ésta no cumple las exigencias mínimas requeridas, se transforma en una rutina pasajera. La anamnesis ("recuerdo"), interrogatorio o entrevista tiene sus reglas, aunque se aplican de una forma personal que caracteriza a cada clínico. Ver hacer la anamnesis a un médico experto, cómo precisa las circunstancias de la dolencia, delimita la sintomatología, cómo se adapta a la mentalidad y lenguaje de cada paciente y cómo confiere orden y lógica a los datos recogidos es algo que no enseñan los libros, y su ingenio radica en su realización. Por ello, siendo en apariencia el procedimiento clínico más fácil, resulta el más difícil en la práctica; cualquier otro método exploratorio tiene más un componente técnico que personal, desde la percusión del bazo o del hígado hasta la lectura de una radiografía o de una TAC. Hacer la anamnesis exige al médico conocer desde los matices de la enfermedad hasta la psicología y cultura del paciente. El clínico se forja siguiendo una buena escuela que lo eduque para ser un buen observador y un buen razonador, proceso que no se improvisan (26). El clínico no nace, se hace; sin embargo, no se hace de cualquier barro; como para todas las artes se requiere una disposición o vocación que resulta de una mezcla de valores y cualidades muy difíciles de precisar (27).

Si no se escucha con atención al paciente, no existe una comunicación adecuada; el enfermo se siente desatendido, no tiene confianza en el médico y por tanto no se establece una idónea relación médico-paciente, cuyo resultado es que el paciente no colabora lo necesario en la asistencia de su proceso, e incluso que no cumple el tratamiento prescrito o ni siquiera lo inicia (28); recordemos que, según el pensamiento de William Osler, *el médico tiene dos oídos y una boca para escuchar el doble de lo que habla*. Un ejemplo que demuestra la poca predisposición de algunos médicos para escuchar a los enfermos es el trabajo publicado en 1984 por Beckman y Frankel (17) después de analizar la actitud de los médicos de un hospital de Detroit (EEUU) al hacer la anamnesis a los afectados. Los resultados fueron devastadores. Según la investigación realizada, el médico dejaba de escuchar al paciente en promedio a los 18 segundos de haber comenzado a hablar y en ocasiones, cuando solo habían transcurrido cinco segundos. Solo el 23% de los pacientes pudo completar el relato de su dolencia.

Toda historia clínica mal hecha es un conjunto de datos sin valor práctico. Su estilo es diverso y aunque hay historias clínicas que lo expresan todo con un lenguaje preciso, en la mayoría, al revisarlas, se comprueba que muchas veces el médico no acierta a transcribir el proceso patológico y que no posee la capacidad mínima de redacción para ello, por eso suple la historia clínica con sucedáneos, (8,29). Para redactar una buena historia clínica se necesitan, además de saber mucha patología, dotes intelectuales, cultura, sosiego y tiempo, requisitos no siempre coexistentes entre los médicos. Tan importante es la cultura que el exitoso médico y escritor español José Letamendi (1828-1897) decía que *el médico que solo sabe medicina ni medicina sabe*, y el ya citado William Osler manifestaba a sus alumnos que *el estudiante que no es culto no será ni culto ni médico*.

La carencia de habilidades clínicas (saber hacer) está muy generalizada; se debe a la falta de práctica asociada a la poca exigencia de las mismas por los docentes clínicos. ¿Por qué estas deficiencias se generan, persisten y aumentan? La respuesta, es doble (23): a) los valores y prioridades de la sociedad han cambiado; el sentido de la responsabilidad y el orgullo del trabajo bien hecho han decaído de modo notable, y b) la mayoría de los clínicos docentes se formaron después de los años 70, época en que se iniciaron las nuevas tecnologías. La medicina *high-tech* o medicina tecnológica, es "todo" lo que vieron y aprendieron, y, por ello, la que pueden enseñar, en detrimento de la medicina *high-touch*, de la que muchos carecen.

La medicina *high-touch* es una medicina basada en una historia clínica bien elaborada junto a una pertinente y correcta exploración física y a una interpretación crítica de la información obtenida. Sólo entonces se deciden qué análisis y pruebas se necesitan,



y, si proceden, deben pedirse de las más simples a las más complejas. Por el contrario, la medicina *high tech* suprime, en general, la historia clínica y la exploración física y, muchas veces para complacer al enfermo, consiste en solicitar directamente diversos análisis y pruebas que, casi siempre, incluyen una RM, una TAC, o ambas.

No cabe duda que la avanzada tecnología médica ha aumentado la capacidad de diagnosticar y tratar enfermedades que hace no muchos años era impensable, pero también ha fomentado la pereza, especialmente la mental, entre muchos médicos. La excesiva confianza en la tecnología impide al facultativo utilizar la más sofisticada herramienta que tiene disponible: el cerebro.

Actualmente, hay una crisis en la aplicación correcta del método clínico, debido a un progresivo menosprecio de la clínica asociado a una creciente debilidad en el desarrollo de las habilidades semiológicas y clínicas, sobrevaloración de la tecnología, falta de tiempo en la consulta médica y desinterés por entablar una idónea relación médico-paciente (13).

Conseguir que todos los graduados sean médicos y clínicos cabales es condición *sine qua non* para recuperar la medicina *high-touch*, ¿Cómo y dónde? Cualquier medida será difícil porque implicará una renovación de la enseñanza y un cambio de mentalidad de muchos de los clínicos docentes actuales. En general, el médico recién egresado posee muchos conocimientos teóricos y poca experiencia clínica; ello es debido a que la mayoría de las facultades de Medicina transmiten en exceso saberes teóricos y no forman al alumno mediante actividades dinámicas y saberes vivos; se cultiva el memorismo en vez de enseñarles *a pensar, a analizar y a ser críticos*. No se enseña lo suficiente al lado de la cama del enfermo, los estudiantes permanecen poco tiempo junto a los pacientes y cuando están en el hospital son tutorados por los clínicos más jóvenes, con las limitaciones que esto conlleva. Algo tan básico como interrogar, palpar un abdomen o identificar un soplo cardíaco se debe aprender en el hospital junto al paciente, ya que *el verdadero santuario de la ciencia médica está en la cabecera del enfermo*. Se trata de aprender directamente al lado del enfermo aquellos aspectos técnicos y humanos requeridos para realizar la historia clínica (anamnesis) y la exploración física de manera correcta y completa. Es un aprendizaje (enseñanza) predominantemente clínico a la que solo se accede cuando se haya adquirido conocimiento suficiente de las ciencias médicas básicas y de la conducta en el individuo normal (30). No hay parte más artística y humana de la relación médico-paciente que la exploración física correctamente realizada y la información que se puede obtener de la misma; la exploración es el arte de interpretar los síntomas subjetivos de la enfermedad en el paciente: *de escuchar una historia contada sin palabras*.

Para promover la medicina *high-touch*, los docentes tienen que asumir que su objetivo es educar y que, por ello, deben enseñar el valor del arte clínico; qué pruebas solicitar, cuándo y cómo interpretarlas; a elegir primero el estetoscopio, no el fonocardiograma para detectar una cardiopatía; a utilizar las manos, no la TAC, para diagnosticar una hepatomegalia, y a solicitar tecnologías avanzadas para verificar más que para formular sus impresiones clínicas. En síntesis: enseñar a utilizar el cerebro, los sentidos y el corazón para asistir a los enfermos. Han de enseñar también el valor de la eficiencia, haciendo realidad el médico "cinco estrellas" definido por la OMS, en el que destacan las funciones de decisor, que elige qué tecnologías aplicar ética y económicamente, y de gestor, orientando su actuación hacia la satisfacción de las necesidades de los pacientes y de la comunidad. Tan importante es la eficiencia, que en nuestro país las acciones clínicas sin valor consumen el 30% del presupuesto sanitario.

Es recomendable aprender de quienes practican buena medicina en los Centros de Atención Primaria, ya que lo que hacen cada día esos médicos pueden tener poco parecido con lo que los estudiantes oyen en las aulas. Además, buena parte de la experiencia clínica debería adquirirse en el mundo real, supervisada por médicos avezados y con sentido común. Es conveniente y lógico que los alumnos conozcan el primer nivel asistencial, en el que se solucionan el 90% de los problemas de salud de los ciudadanos y en el que ejercerán el 40% de los graduados.

La formación clínica del estudiante ha de basarse, en esencia, en dos supuestos: a) conceputar la Medicina como un saber hacer sobre el hombre; lo que implica dar un carácter humano concreto a toda la docencia médica. La Medicina es arte, ciencia, técnica, humanismo y empirismo; tratamiento del ser humano enfermo. El paciente no es un "caso clínico", ni un número en una lista de espera, es una persona con sentimientos y emociones, "no hay enfermedades sino enfermos"; *es más importante saber qué persona tiene la enfermedad que qué enfermedad tiene la persona*, y b) equilibrar las enseñanzas científico-técnicas con el aprendizaje riguroso del arte clínico.

En la metodología educativa de la Medicina, además de un programa teórico (área cognitiva), se incluyen, en las áreas de habilidades y actividades, los procedimientos *biótico* (aprendizaje por la vivencia), *práxico* (aprendizaje por la acción) y *ergodidáctico* (aprendizaje por la autoactividad). A partir del perfil o programa adoptado se pueden definir previamente qué cambios en los conocimientos (área cognitiva), en las aptitudes y habilidades (área de psicomotricidad) y en las actitudes (área de la afectividad) deben ser alcanzados. Al final del proceso educativo y de cada una de sus



fases, el pregraduado deberá haber incorporado una serie de conocimientos, capacidades y comportamientos que no poseía previamente. El objetivo general es conseguir médicos generales competentes, teniendo siempre presente que *ser competente significa que se poseen los conocimientos y habilidades que permiten una asistencia a los enfermos basada en los principios actuales de la medicina*.

El postgraduado no solo debe saber, conocer y saber hacer lo relacionado con su profesión, sino que también debe conocer la "ciencia" social y humana, ya que la actuación de un médico es incompleta si desconoce los aspectos psicológicos y sociales del paciente. El avance de la Medicina no consiste solo en el desarrollo técnico estricto, sino en el esfuerzo dirigido a modificar positivamente la totalidad psicofísica del enfermo; por eso, una Medicina que no sea personal, no solo no es un progreso sino que incluso puede transformarse con facilidad en un factor yatrógeno.

En la Medicina actual, merced al "espíritu" de la técnica, priman sobre la calidad de la exploración y su sentido artesanal (que exige tiempo y formación) el sentido de economía y rapidez, que llevan en pacientes determinados a prescindir de la historia clínica y de la exploración directa, de las técnicas elementales y personales, para solicitar un cúmulo de análisis y pruebas complementarias y con ellos establecer el diagnóstico. La educación médica exige una formación clínica del pregraduado, restaurando las bases del arte clínico; si no se hacen bien la anamnesis, la exploración física, los diagnósticos y tratamientos, se renuncia a un pasado clínico de siglos, que es el patrimonio intangible de la profesión médica. Conceder a la palabra y al razonamiento lógico la jerarquía intelectual que le corresponde podría evitar una injustificable subordinación o una irracional dependencia de lo que debería subordinarse a ellos; no hacerlo expone al automatismo del dato y al menosprecio de la insustituible comunión con el paciente que sufre, y del ejercicio creativo de hablar, escuchar, contextualizar y reflexionar.

No existen razones para abandonar el método clínico; todo lo contrario. El médico debe ejercer con ciencia y conciencia, aplicar sus conocimientos para evaluar los problemas de salud del paciente, después solicitar las pruebas complementarias para verificar su hipótesis y al mismo tiempo, conocer la validez de la prueba demandada, su valor predictivo positivo o negativo, y de acuerdo con éstas, tomar decisiones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas (12).

Solo conociendo el valor y la relevancia del método clínico, aplicándolo y enseñándolo a los futuros egresados se evitará que los médicos se conviertan en profesionales mecánicos e irracionales, simples prescriptores de análisis y pruebas desarticuladas e innecesarias y revisores de resultados. El método clínico es una parte

esencial del proceso diagnóstico del enfermo, al ser un proceso sistemático, ordenado y reproducible, que evita que el médico haga afirmaciones al azar o por sentido común; permite investigar no solo la enfermedad del paciente sino del ser humano concreto desde un enfoque biopsicosocial.

Sin ignorar todos los avances tecnológicos y los beneficios que de ellos se derivan al servicio del enfermo, la clínica, la semiología, las habilidades semiotécnicas y el método clínico deben promoverse con la ejemplaridad y continuar enseñando en los centros docentes, haciendo especial énfasis en la importancia que tiene para el correcto desempeño profesional, siendo enriquecido con la mejor evidencia de la medicina.

En las facultades de Medicina se debe formar a los alumnos de acuerdo con lo que será su ejercicio profesional. No se les puede instruir para la práctica de una Medicina muy sofisticada y tecnificada ya que casi la mitad de ellos no la ejercerá de ese modo, hacerlo podría ser causa de frustraciones y fracasos. El objetivo es que el estudiante adquiera conocimiento, habilidades y competencias que le permitan su posterior especialización. Lo importante son los alumnos, no los profesores.

Es evidente la importancia que tiene para el médico poder desarrollar habilidades de tipo humanístico que le permitan fortalecer sus destrezas para realizar un ejercicio integral de su profesión (31-34). Sería deseable la existencia de espacios académicos y extraacadémicos durante la formación médica que promuevan el desarrollo de habilidades humanísticas; buen modelo de ello son los múltiples ejemplos de médicos en el mundo que han logrado compatibilizar adecuada y exitosamente el ejercicio de su profesión con el de diversas actividades artísticas: entre otros, los muy conocidos David Livingstone (1813-1873). Alexander Borodin (1833-1887), William Somerset Maugham (1874-1965), Albert Schweitzer (1875-1965) y Enoch Cancino Casanova (1928-2010).

Es imprescindible implementar el necesario y positivo avance de la ciencia con la práctica de una Medicina más humanista. Mejorando el humanismo médico se debería contrariar la caústica opinión de Voltaire sobre los médicos: *Los médicos son hombres que prescriben medicinas de las que saben poco, curan enfermedades de las que no conocen menos, en seres humanos de los que no saben nada*. La humanización es mucho más que la dignificación de la asistencia médica; una relación entre cuidadores y cuidados eminentemente humana que no puede ni debe perderse por los avances tecnológicos.

9. REFERENCIAS

1. Snow CP. The two cultures and the scientific revolution. Cambridge University Press, 1959.



2. Marsiglia IG. Physician-patient relationship: cornerstone in clinical medicine. *Am Coll Physicians* 2004; 3: 12-18.
3. Jolkowitz AB, Clarfield M. The physician as comforter. *Eur J Int Med* 2005; 16: 95-96.
4. Marsiglia IG. Impacto de la tecnología médica sobre la historia clínica y la relación médico-paciente. *Gac Méd Caracas* 2006; 114: 183-189.
5. Vicente Valdivieso D. La Medicina Clínica: Una Visión Personal. *Rev Chil Pediatr* 2004; 75: 417-419.
6. Díaz Berenguer A. ¿Por qué la medicina sigue siendo un arte? *Arch Med Int* 2012; 34: 33-35.
7. López Merino V. La medicina como ciencia arte, ciencia y humanismo. Discurso de Recepción. *An Reial Acadèmia Comunitat Valenciana*, 2011.
8. De Vega Fernández-Crespo R. Ocaso del arte clínico. Discurso Inaugural. *Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*. Valladolid. Sever Cuesta, 1980.
9. De Portugal Alvarez J. El médico: saber, poder, sentir. *Anales RADE* 2018 (Nº Extraordinario); 3: 413-434.
10. Hinich H. Algunas causas frecuentes y evitables de errores de diagnóstico. *Rev Fac Med UNAM* 1997; 40: 136-140.
11. Gudiol Munté F. "Ojo clínico" y evidencia científica. *Educación Médica* 2006; 9 (Supl. 1): 21-23.
12. Ilizástegui Dupuy F. El método clínico: muerte y resurrección. *Medi-Sur* 2010; 8: 52-62.
13. Frómata Guerra A, Sánchez Figueredo SA, Mayo Castro MA, Jara Lalama J, Valarezo Sevilla DV. El método clínico; Perspectivas actuales. *Rev Bionatura* 2017;2: 255-260.
14. Arteaga Herrera J, Fernández Sacasas JA. El método clínico y el método científico. *Medisur* 2010; 8:12-20.
15. Rich EC, Terry WC, Harris IB. The diagnostic value of the medical history. Perception of internal medicine physicians. *Arch Intern Med* 1987; 147: 1957-1960.
16. De Vega R. Grandeza y menosprecio del arte clínico. *Bol Patología Médica (Madrid)* 1962: 1983-1990.
17. Beckman HB, Frankel RM. The effect of physician behaviour on the collection data. *Ann Intern Med* 1984; 101:692-698.
18. Nassar ME. The stethoscopeless cardiologist. *J R Soc Med* 1989; 82:573-574.
19. Feddock CF. The lost art of clinical skills. *Am J Medicine* 2007; 120: 374-378.
20. Faustinella F, Jacobs RJ. The decline of clinical skills: a challenge for medical schools. *Int J Med Educ* 2018; 9: 195-197.
21. Tucker NH. President 's Message. Medicine versus science. *Jacksonville Medicine* 1999; 50: 234-240.
22. Jaim Etcheverry G. El debate entre la ciencia y el arte de la medicina (Editorial). *Arch Argent Pediatr* 2011; 109: 290-291.
23. Fred HL. Hyposkillia-Deficiency of clinical skills. *Texas Heart Institute J* 2005; 32: 255-257.
24. Fred HL. The downside of medical progress. The morning of a medical dinosaur. -*Texas Heart Inst J* 2009; 36: 4-7.
25. Engel GE, Morgan WL. Interviewing and patient care, Philadelphia. Saunders, 1973.
26. Castañeda G. la clínica en el arte de hacer clientela, 1ª edición. México IGH 1997: 19-25.
27. Mezquita Ortiz JF. El arte del diagnóstico. *Rev Int Mex* 2006; 22: 246-252.
28. García Núñez R. El método clínico en la Atención Primaria de Salud. Algunas reflexiones. *MediSur* 2010; 8: 144-155.
29. Soto-Arnáez F, Sebastián-Viana T, Carrasco-Garrido P, Fernández de las Peñas C, Parás-Bravo P, Palacios-Ceña D. A descriptive study of the knowledge of nurses and doctors of clinical abbreviations in hospital discharge reports. *Enfermería Clínica* 2019; 29: 302-307.
30. Ribera Casado JM. La enseñanza médica teórica y en la cabecera del enfermo. *Educ Méd* 2016; 17: 45-50.
31. Oseguera Rodríguez JF. El humanismo en la educación médica. *Rev Educación* 2006; 30: 51-63.
32. Sánchez Martín MM. Humanidades médicas; integrar arte y ciencia en la Medicina. *Rev Esp Cir Osteoarticular* 2014; 49:187-196
33. Romero Leguizamón CR. ¿Medicina; arte o ciencia? Una reflexión sobre las artes en la educación médica. *Educ Méd* 2018; 19:159-168.
34. Simon HB. Medicine and humanities: joining two cultures. *Am J Med* 2012; 125: 1144-1145.

Si desea citar nuestro artículo:

Decadencia del arte clínico y auge de la medicina tecnológica

José Antonio Rodríguez Montes

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 123- 133

DOI: <http://>

OTTO LOEWI: CIEN AÑOS DE LA CONFIRMACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN QUÍMICA

OTTO LOEWI: ONE HUNDRED YEARS OF CONFIRMATION OF CHEMICAL NEUROTRANSMISSION

Albino García Sacristán

Catedrático emérito de Fisiología en la UCM. Académico de Número de la RANF

corresponding author: agarcias@ucm.es

FIGURAS DE LA CIENCIA

RESUMEN

En 1921, Otto Loewi publicó un estudio experimental que dio origen al nacimiento de la teoría química de la transmisión nerviosa, según la cual, la corriente nerviosa provoca, en el extremo de las fibras nerviosas, la liberación de una sustancia química que se llamó neurotransmisor. Por sus descubrimientos relacionados con la neurotransmisión química de los impulsos nerviosos, Loewi recibió en 1936 el Premio Nobel de Fisiología o Medicina.

Palabras Clave:

Otto Loewi
Neurotransmisión química
Neurotransmisores

Keywords:

Otto Loewi
Chemical neurotransmission
Neurotransmitters

ABSTRACT

In 1921, Otto Loewi published an experimental study that gave rise to the birth of the chemical theory of nerve transmission, according to which, the nerve current causes, at the end of nerve fibers, the release of a chemical substance called a neurotransmitter. For his discoveries related to the chemical neurotransmission of nerve impulses, Loewi received the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1936.

En 1921, Otto Loewi publicó el estudio experimental: *"Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung"*. Este trabajo acerca de la transmisión humoral en la acción de los nervios cardíacos dio origen al nacimiento de la teoría de la neurotransmisión química, según la cual la transmisión de impulsos entre neuronas, como también entre neuronas y efectores, se resuelve en su mayor parte mediante la liberación de sustancias químicas que se denominan neurotransmisores. Con este descubrimiento Loewi inauguró toda una nueva era en las neurociencias que nos permiten explicar la acción de numerosos medicamentos así como las señales eléctricas que facilitan al cerebro pensar, al corazón latir y al músculo contraerse.

A principios del siglo XX se pensaba que las señales del sistema nervioso se transmitían mediante impulsos eléctricos. Así, el histólogo italiano Camilo Golgi, proponía que el sistema nervioso poseía una estructura reticular, es decir, no había en él células individuales como en otros tejidos, sino que las neuronas estaban totalmente conectadas a través de sus prolongaciones. Por el contrario, Santiago Ramón y Cajal establece que las neuronas se encuentran estrechamente interconectadas constituyendo unidades independientes y que la comunicación entre las células nerviosas no es por medio de una malla o retículo, según defendía Golgi, sino por contacto funcional a través del cual las terminaciones libres de los axones de las fibras nerviosas se ponen en relación con la membrana plasmática de la célula siguiente (Fig. 1). Pero la teoría neuronal de Cajal generaba una duda inmediata; ¿cómo se transmitía la señal?.

La discusión existente a finales del siglo XIX y principios del siglo XX entre la teoría reticular de Golgi y la teoría neuronal de Cajal tuvo una continuidad posterior cuando se comenzaron a estudiar los mecanismos mediante los cuales se producía la transmisión de la información de unas neuronas a otras, es decir, los procesos de comunicación interneurona. El concepto de sinapsis fue acuñado por Charles Sherrington para definir las zonas especializadas de contacto entre las neuronas donde tiene lugar la transmisión de información en el sistema nervioso. Por tanto, durante las primeras décadas del siglo XX hubo una polémica entre los partidarios de las sinapsis eléctricas, que serían aquellas en las que la transmisión de información se debía a procesos exclusivamente eléctricos, y los partidarios de las sinapsis químicas en las que los fenómenos de naturaleza eléctrica en las neuronas postsinápticas eran desencadenados por la liberación de una sustancia química (1).

La primera observación surge en 1904, cuando Thomas Elliot, mientras estudiaba fisiología con John Newport Langley en Cambridge, postuló que *"la adrenalina puede ser el estimulante químico que se libera de los nervios simpáticos cuando el impulso nervioso llega a la periferia"*. Esta hipótesis, atrevida y profética al mismo tiempo, tuvo mala suerte en su formulación. Por una parte se anticipó en bastantes años a los acontecimientos que permitirían aceptar además de la transmisión electrogénica, la transmisión química, y por otra parte, al escoger a la adrenalina precisamente, cometió un error cuyas consecuencias habían de servir de argumento para desechar la hipótesis. Así, por ejemplo, Henry Hallet Dale, catedrático de Farmacología en la Universidad de Cambridge y que

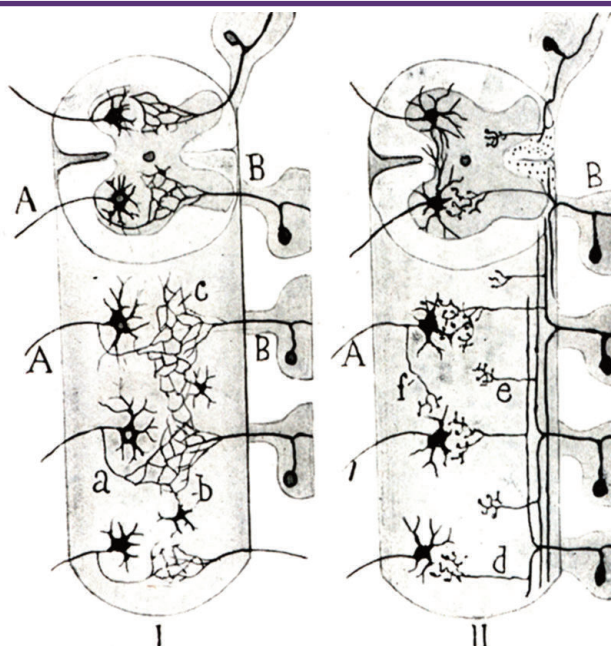


Figura. 1. Dibujo de Cajal representando un corte de médula espinal donde sinaptan neuronas sensoriales (B) y neuronas motoras (A). En la parte I, según la teoría reticular de Golgi, y en la parte II, según la teoría neuronal de Cajal.

tanto contribuyó después al desarrollo del concepto de la neurotransmisión química, fue quien primero discutió la teoría de Elliot en base a las diferencias reales que existían entre los efectos de la adrenalina y los de la estimulación del sistema nervioso simpático (2).

En 1907, Walter Dixon, observó la similitud entre los efectos del alcaloide muscarina, aislado del hongo venenoso *Amanita muscaria*, y las respuestas a la estimulación vagal. Ante estos datos experimentales, Dixon afirmó que *"la excitación de un nervio induce liberación local de una hormona que produce actividad específica por combinación con algún componente del órgano terminal, músculo o glándula"*. Pero esta hipótesis tropezó con el escepticismo universal que lo desalentó de proseguir esta prometedora investigación (3).

William Henry Howell en 1908, sugirió que la estimulación vagal liberaba potasio en el corazón y que esta era la causa del efecto resultante.

En 1914, Dale, efectúa un minucioso estudio de las cualidades farmacológicas de la acetilcolina, comprobando que esta sustancia reproducía las respuestas a la estimulación del nervio vago, llegando a la suposición de que la pretendida sustancia liberada por el vago fuese la acetilcolina (4).

La prueba definitiva de la neurotransmisión química se produce en 1921, cuando Otto Loewi, demostró por medio de un sencillo experimento la existencia de un mediador químico al estimular los nervios autónomos. Loewi aisló los corazones de dos ranas, el primero con sus nervios y el segundo sin ellos. El nervio vago del primer corazón fue estimulado eléctricamente, ocasionando, con ello, una disminución de la frecuencia y fuerza de contracción cardíaca. La

solución salina con la que había perfundido el corazón estimulado, la transfirió al otro corazón, observando también en este segundo corazón una disminución de su frecuencia y fuerza de contracción (Fig. 2). Los resultados demostraban que los nervios no influyen directamente sobre el corazón sino que liberan de sus terminales sustancias químicas específicas que, a su vez, provocan las modificaciones de la función cardíaca características de la estimulación de sus nervios. Loewi llamó *"vagusstoff"* (sustancia del vago) a esta sustancia química. Loewi descubrió también que, la estimulación de los nervios simpáticos liberaban una sustancia semejante a la adrenalina, que aumentaba la frecuencia y fuerza de contracción del corazón, a la cual llamó *"acceleransstoff"* (sustancia aceleradora) (5). En 1926, Loewi y Navratil ofrecieron pruebas que identificaban a la *"vagusstoff"* como la acetilcolina (6). La *"acceleransstoff"* fue aislada de los nervios adrenérgicos e identificada en 1946 por Ulf von Euler, como noradrenalina.

Durante muchos años los únicos neurotransmisores reconocidos en el sistema nervioso autónomo fueron la acetilcolina y la noradrenalina. Sin embargo, a partir de los años sesenta del siglo pasado diversos estudios empiezan a observar efectos neurovegetativos excitadores e inhibidores que no eran mediados por ninguno de los neurotransmisores clásicos. Aunque las acciones de la acetilcolina y la noradrenalina, como principales neurotransmisores del sistema nervioso parasimpático y simpático, aún brindan la estructura esencial para el estudio de la función autónoma, muchos otros mensajeros químicos, como purinas, múltiples neuropéptidos (VIP, encefalinas, somatostatina, NPY, taquicinas, CGRP, etc.), eicosanoides, dopamina, serotonina, etc., modulan o median las respuestas que ocurren tras la estimulación de neuronas del sistema nervioso (1).

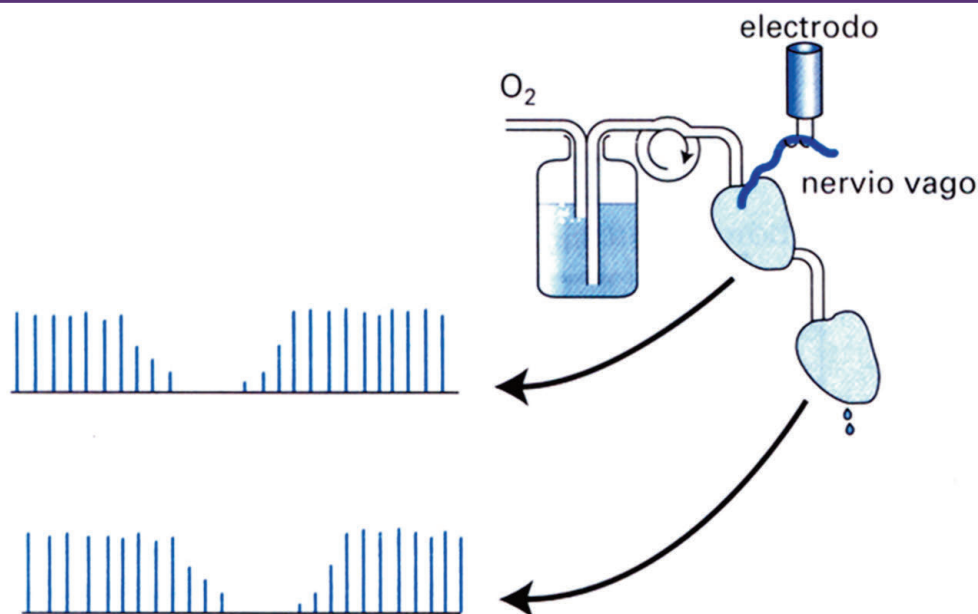


Figura. 2.- Experimento de Loewi que demostró la neurotransmisión química.

A finales del siglo XX se identifican, que además de los neurotransmisores líquidos, también existen transmisores gaseosos. Diversos estudios han confirmado la acción del óxido nítrico (NO) en el sistema nervioso central y periférico. La presencia de NO en el sistema nervioso plantea la necesidad de revisar el concepto tradicional de neurotransmisión química. El NO se sintetiza en algunas neuronas, produce efectos funcionales sobre otras, ejerciendo una función de mensajero intracelular y, sin embargo, no cumple muchos de los requisitos exigidos a una sustancia para considerarla un neurotransmisor. Así, el NO no se almacena en vesículas ni se libera por exocitosis, sino que, una vez sintetizado, se difunde en la zona próxima. Esto implica que, al contrario que otros neurotransmisores, carezca de direccionalidad, y pueda actuar tanto sobre las neuronas postsinápticas como sobre las presinápticas, es decir pueda ser un mensajero anterógrado o retrógrado. Asimismo, no actúa a través de receptores de membrana, sino que penetra en las células próximas, afectando directamente a las proteínas diana. Otra diferencia es que no existe ningún mecanismo específico de recaptación o de degradación enzimática del transmisor, cuya acción termina debido a su oxidación espontánea. El conocimiento, en estos últimos años, de las funciones que el NO tiene en diversos sistemas orgánicos como el cardiovascular, respiratorio, urogenital o nervioso y en procesos inmunológicos e inflamatorios está permitiendo comprender diversos mecanismos funcionales, que pueden facilitar eficaces alternativas terapéuticas. Por la importancia que el NO tiene en el mantenimiento de la homeostasis, algunos investigadores han llegado a afirmar que la mayoría de las enfermedades guardan relación con cambios en la forma en que el organismo metaboliza el

NO y el O₂, entre ellas las enfermedades cardíacas y la hipertensión, la apoplejía, el asma, muchos tipos de cáncer, la anemia, la tuberculosis, la artritis, etc. Recientemente se ha demostrado que otros gases como el monóxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno, también participan en diversos procesos funcionales (1).

Otto Loewi nació en Frankfurt del Meno (Alemania) en 1873. Estudió medicina en las Universidades de Munich y posteriormente en Estrasburgo, donde se licenció en 1893 y obtuvo su doctorado en 1896, bajo la dirección del eminente farmacólogo Prof. Oswald Schmiedeberg.

De 1897 a 1898, trabajó como médico en el Hospital de Frankfurt. Al comprobar la alta mortalidad en casos de tuberculosis y neumonía crónicas debido a la falta de una terapéutica apropiada, decidió abandonar la actividad clínica y, en su lugar, dedicarse a la investigación fisiológica y farmacológica.

En 1898, se trasladó a la Universidad de Marburg (Alemania) para trabajar como ayudante del reconocido farmacólogo Hans Horst Meyer. En esta Universidad los estudios de Loewi se orientaron en el campo del metabolismo. Estudió la acción de la florizina, potente inhibidor del transporte de la glucosa en los túbulos renales que bloquea la reabsorción tubular proximal de la glucosa, cuando las concentraciones plasmáticas de ésta están por encima de lo normal. Investigó el metabolismo de los ácidos nucleicos, así como la síntesis de proteínas en el organismo animal, demostrando que estos pueden reconstruir sus proteínas a partir de los aminoácidos, un descubrimiento esencial con respecto a la nutrición. También publicó una serie de artículos experimentales sobre la fisiología y farmacología de la función renal. En 1900, fue nombrado "*Privatdozent*".

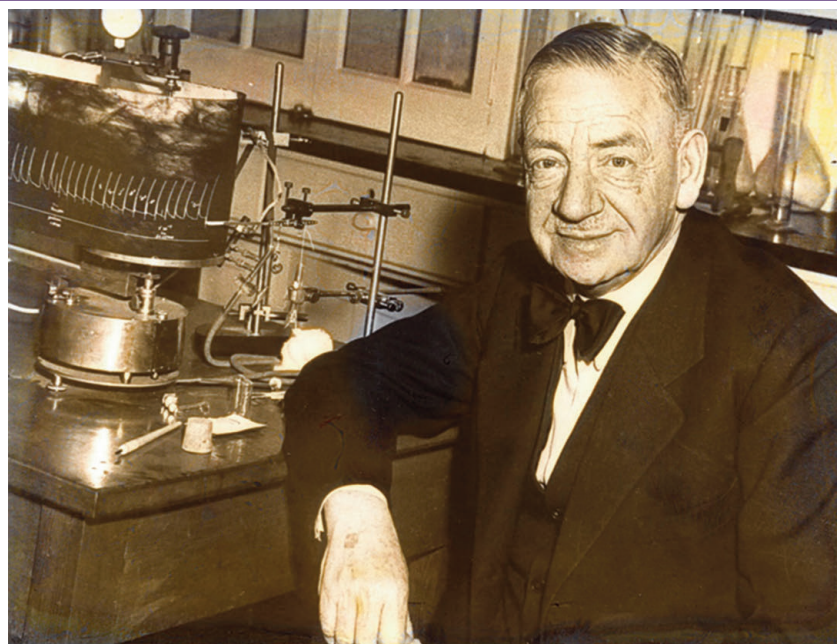


Figura. 3. Otto Loewi en su laboratorio de la Universidad de Graz.



En 1902, Loewi se incorpora al laboratorio de Ernest Starling en la Universidad de Londres donde trabaja con William Maddock Bayliss y conoce en Cambridge a Thomas Elliot y a Henry Dale, con quien posteriormente compartiría el Premio Nobel y una gran amistad a lo largo de su vida.

Tras su estancia en Londres, regresa a Marburg donde continuó estudiando la función renal y el mecanismo de acción de los diuréticos.

En 1905, se traslada a la Universidad de Viena como profesor asociado en la cátedra de H.H. Meyer, donde estudia los problemas relacionados con el metabolismo de los carbohidratos. También demostró que el corazón a diferencia del hígado, no puede utilizar fructosa. Conjuntamente con Alfred Fröhlich, estudia las dos divisiones motoras simpática y parasimpática que había establecido J. N. Langley para el sistema nervioso autónomo, así como los resultados que había obtenido Elliot con la adrenalina.

En 1908, se casó con Guida (1889-1958), hija de Guido Goldschmiedt, catedrático de química en Praga y posteriormente en Viena, con la que tuvo tres hijos, Hans, Victor y Guido, y una hija, Anna.

En 1909, es nombrado catedrático de farmacología en la Universidad de Graz (Austria). Es en esta Universidad donde Loewi investigó como los órganos vitales responden a la estimulación química y eléctrica. El estudio de Loewi, publicado en 1921, permitió en gran medida aclarar la controversia sobre si las células usaban transmisión química o eléctrica, demostrando que en la mayoría de ellas se resuelve mediante la liberación de sustancias químicas.

Por sus descubrimientos relacionados con la transmisión química de los impulsos nerviosos, Loewi recibió en 1936 el Premio Nobel de Fisiología o Medicina, que compartió con Dale.

Al invadir los alemanes Austria en marzo de 1938, Loewi y dos de sus hijos fueron arrestados y encarcelados varios meses por la Gestapo, la noticia de su difícil situación llegó al Congreso Internacional de Física en Zúrich, donde un alboroto internacional de científicos y amigos provocó su liberación. Antes, en presencia de hombres de la Gestapo tuvo que entregar todas sus posesiones y transferir el dinero obtenido con el Premio Nobel a una cuenta de un banco controlado por los nazis. Con permiso para salir de Austria, Loewi llegó a Inglaterra en septiembre de 1938. Allí vivió con Dale durante varias semanas antes de que le ofrecieran un puesto en el Instituto Nuffield de Oxford. Al año siguiente, Loewi emigró a Estados Unidos, aceptando un puesto como profesor investigador de farmacología en la Universidad de Nueva York. En 1941, Otto Loewi obtiene la ciudadanía de ese país donde residió hasta su fallecimiento en Nueva York el 25 de Diciembre de 1961 (1, 7).

Si la teoría neuronal de Cajal supuso la semilla a partir de la cual se instauró la neurociencia, los estudios de Loewi

sentaron las bases de la neurotransmisión química, que ha facilitado comprender y definir el concepto de sinapsis y de los neurotransmisores químicos, lo que ha determinado poder explicar los mecanismos de regulación en los diferentes procesos funcionales, así como la posibilidad de generar alternativas terapéuticas eficaces que permitan corregir las disfunciones orgánicas.

2. REFERENCIAS

1. García Sacristán A. Neurotransmisión: de la acetilcolina al óxido nítrico. En: Libro Conmemorativo de los XXV años de la fundación de la Asociación Alexander von Humboldt de España. Ed. AvH España, 2017; pp. 257-262. (ISBN 978-84-8187-256-9).
2. Elliot TR. The action of adrenalin. J Physiol Lond 1905; 32: 401-467.
3. Dixon WE. On the mode of action of drugs. Med Mag Lond 1914; 16: 454-457.
4. Dale H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. J Pharmacol Exp Ther 1914; 6: 147-190.
5. Loewi O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pflügers Arch ges. Physiol 1921; 189: 239-242.
6. Loewi O, Navratil E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. XI. Mitteilung: Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. Pflügers Arch ges Physiol 1926; 214: 689-696.
7. Loewi O. Nobel Lecture: The Chemical Transmission of Nerve Action. 1936.

Si desea citar nuestro artículo:

Otto Loewi: cien años de la confirmación de la neurotransmisión química

Albino García Sacristán

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 135 - 139

DOI: <http://>

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTESTINAL MEDIANTE LA INGESTA DE COMPUESTOS DE MAILLARD Y SU INTERACCIÓN CON LOS RECEPTORES RAGE Y GPR43

REGULATION OF THE INTESTINAL INFLAMMATORY RESPONSE THROUGH THE INGESTION OF MAILLARD COMPOUNDS AND THEIR INTERACTION WITH RAGE AND GPR43 RECEPTORS

Silvia Pastoriza¹, José Ángel Rufián-Henares^{1,2*}

¹Departamento de Nutrición y Bromatología, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Granada.

²Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Universidad de Granada.

corresponding author: jarufian@ugr.es

ARTÍCULO

RESUMEN

Las señales de daño molecular atraen a los neutrófilos hasta los lugares donde hay infección o inflamación. El receptor acoplado a la proteína G (GPR43) y el receptor para los compuestos avanzados de glicosilación (RAGE) reconocen a ácidos grasos de cadena corta (propionato y butirato) y AGEs (compuestos avanzados de glicosilación) respectivamente, estando ambos receptores abundantemente expresados en los neutrófilos y las células del epitelio intestinal. El papel funcional que juega la activación de estos receptores en la orquestación *in vivo* de la respuesta inmune no está claro. Nuestro trabajo examina el efecto de la ingesta de AGEs sobre la respuesta inmune, tanto en ratones sanos como en ratones a los que se les indujo una colitis, utilizando ratones transgénicos deficientes en los receptores GPR43 o RAGE. Uno de los principales hallazgos es que tanto el receptor GPR43 como el RAGE son necesarios para el reclutamiento de los neutrófilos en un modelo de inflamación intestinal por lesión de la barrera mucosa. Así mismo hemos comprobado que los AGEs ingeridos con la dieta promueven la aparición de un desequilibrio en el balance inflamatorio a nivel intestinal, dando lugar a un status proinflamatorio. Igualmente hemos demostrado que la carboximetilisina (CML), un tipo de AGE concreto, es capaz de estimular el receptor GPR43 y actuar como un factor quimioattractor de los neutrófilos. Finalmente, hemos ensayado el tratamiento con sRAGE, proteína capaz de captar AGEs libres. Este procedimiento podría ser una terapia prometedora para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

ABSTRACT

*Molecular damage signals attract neutrophils to sites of infection or inflammation. The G-protein coupled receptor (GPR43) and the receptor for advanced glycosylation compounds (RAGE) recognize short-chain fatty acids (propionate and butyrate) and AGEs (advanced glycosylation compounds) respectively, both receptors being abundantly expressed in neutrophils and intestinal epithelial cells. The functional role that activation of these receptors plays in the *in vivo* orchestration of the immune response is unclear. Our work examines the effect of the ingestion of AGEs on the immune response, both in healthy mice and in mice that were induced to colitis, using transgenic mice deficient in GPR43 or RAGE receptors. One of the main findings is that both the GPR43 receptor and RAGE are necessary for the recruitment of neutrophils in a model of intestinal inflammation due to mucosal barrier injury. We have also verified that the AGEs ingested with the diet promote the appearance of an imbalance in the inflammatory balance at the intestinal level, giving rise to a pro-inflammatory status. We have also show that carboxymethyllysine (CML), a specific type of AGE, is capable of stimulating the GPR43 receptor and acting as a neutrophil chemoattraction factor. Finally, we have tested the treatment with sRAGE, a protein capable of capturing free AGEs. This procedure could be a promising therapy for the treatment of inflammatory bowel disease.*

Palabras Clave:

Enfermedad inflamatoria intestinal
Reacción de Maillard
Carboximetilisina
Alimentos
Tratamiento térmico
RAGE
GPR43

Keywords:

Inflammatory bowel disease
Maillard reaction
Carboximethyllysine
Food
Thermal treatment
RAGE
GPR43



1. INTRODUCCIÓN

El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) recoge una serie de trastornos multisistémicos de etiología desconocida, caracterizados por la inflamación crónica y recurrente del tracto digestivo y cuyos cuadros clínicos más representativos son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (1). La colitis ulcerosa afecta solo a la mucosa del intestino delgado mientras que el síndrome de Crohn afecta a toda la pared intestinal en su conjunto, tanto del intestino grueso como delgado, dando lugar a la formación de fistulas y abscesos.

La etiología precisa de la EII es desconocida e incluye diversos factores genéticos, medioambientales, nutricionales, microbiológicos e inmunológicos (2). De esta forma una respuesta inflamatoria exacerbada del intestino aparece como consecuencia de la reacción inapropiada a distintos agentes luminales, impulsada posiblemente por la microbiota intestinal (3) que sobre regula la síntesis y liberación de distintos mediadores proinflamatorios como metabolitos reactivos del oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), eicosanoides y citoquinas proinflamatorias (4). Todos estos mediadores contribuyen a la cascada patogénica que inicia y perpetúa la respuesta inflamatoria intestinal. El análisis de la flora entérica luminal ha revelado sin embargo diferencias de la composición de esta flora comparada a los controles sanos (5). Las concentraciones de bacteroides, eubacterias, peptostreptococos están incrementadas, mientras que el número de bifidobacterias está significativamente reducido. Una mejora en la integridad de la mucosa intestinal podría contribuir a reducir la inflamación intestinal (6) ya que evitaría la traslocación de endotoxinas y antígenos que sobre regula la respuesta inmunitaria (7). Debido a esto ello se cree que los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) provenientes de la fermentación en el intestino delgado de la fibra dietética podría mejorar la mucosa intestinal, ya que dichos ácidos grasos participan en el mantenimiento de la homeostasis colónica (8). Recientemente se ha descubierto que existe un receptor específico para los SCFA denominado GPR43, que se localiza en la mucosa del íleon (9). La activación de dicho receptor da lugar al reclutamiento de los neutrófilos, que actúan como un factor protector frente a la traslocación bacteriana, pero también como factor perjudicial en la respuesta a una inflamación crónica (10). De esta forma los SCFA actuarían *in vivo* como el interruptor principal para poder alcanzar el umbral crítico de otros estímulos, que dan lugar finalmente a la migración de los neutrófilos. Por todo ello, los SCFA promoverían la activación del sistema inmune de la mucosa en presencia de una barrera mucosa dañada, contribuyendo al desarrollo de la EII (11).

Diversas evidencias científicas parecen indicar que la dieta es uno de los factores medioambientales que más efecto pueden ejercer sobre el desarrollo de la EII (12) y las posteriores recaídas (13). Respecto a los alimentos individuales, los estudios epidemiológicos (12) indican que un bajo consumo de frutas y vegetales en combinación con un alto consumo de azúcares refinados, y grasa favorecen la aparición de EII. En otros estudios (13) se ha examinado el consumo de margarinas, café y alcohol y las dietas ricas en carnes rojas, obteniendo correlaciones positivas entre las recidivas de la enfermedad y la ingesta de alcohol y carnes rojas, especialmente cuando estas están tratadas térmicamente. En ambos estudios se sugiere la necesidad de realizar más estudios de investigación para aclarar la posible asociación entre la dieta y la EII. En los últimos 25 años la dieta de la población española, especialmente en la población infantil y juvenil, está cambiando el perfil mediterráneo por una alimentación más similar a la estadounidense, rica en grasas saturadas y carnes, con disminución en la ingesta de verduras y legumbres (14) y mayor consumo de snacks y productos de bollería (15). Dichos cambios dietéticos se están produciendo en la misma ventana temporal que el incremento en los casos de EII, lo que podría indicar que el mayor consumo de ciertos alimentos podría predisponer a la aparición de dicha enfermedad. Tanto las carnes como los snacks, bollería y productos precocinados tienen en común que sufren una serie de tratamientos térmicos que favorecen su digestión, conservación y aceptación por parte de los consumidores. Sin embargo, el calentamiento da lugar a la aparición de la reacción de Maillard (RM), que está constituida por una serie de reacciones entre proteínas y carbohidratos. Los productos de Maillard están presentes en cantidades considerables en la dieta diaria, debido fundamentalmente a que la mayor parte de los alimentos contienen proteínas y carbohidratos (16).

Entre los productos avanzados que se forman en la RM destacan los compuestos avanzados de glicosilación (Advanced Glycation End products; AGEs) que pueden dañar los tejidos de diversas formas (17): Modificando la funcionalidad proteica mediante la glicosilación, formando enlaces cruzados que dan lugar a rigidez proteica y tisular o incluso interaccionando con células a través de la activación de receptores específicos (RAGE) iniciando una disfunción celular por liberación de sustancias proinflamatorias (18). El RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) es una proteína transmembrana correspondiente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está presente en distintos tipos celulares como células endoteliales, monocitos, microglía e incluso neuronas. La unión AGE-RAGE da lugar a la formación de ROS, los cuales inducen procesos relacionados con la activación celular e inflamación (19).



La principal vía proinflamatoria consiste en la expresión del NF κ B, el cual da lugar a la formación de citoquinas inflamatorias como IL-6 o TNF α . A nivel intestinal, se ha comprobado que la unión AGE-RAGE da lugar a un aumento de la permeabilidad de la mucosa (20). Así mismo, diversos autores han encontrado que la unión AGE-RAGE también incrementa el reclutamiento de células inflamatorias como los neutrófilos (21, 22).

Ante las evidencias científicas presentes en la literatura, el presente trabajo ofrece resultados a cerca de la influencia que una ingesta elevada de AGEs tiene sobre la inflamación intestinal, repercutiendo finalmente en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. En este sentido, se evalúa el efecto que ejerce una proteína glicosilada sobre el epitelio intestinal y la subyacente red inmunitaria, investigando si existe algún tipo de relación entre los receptores RAGE y GPR43.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Preparación de las muestras

Para obtener una proteína glicosilada rica en carboximetil-lisina (CML), uno de los AGEs que estimula al receptor RAGE, se siguió la técnica descrita por Valencia et al (23). De forma breve, se disuelve albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato 150 mM pH 7.4 que contiene ácido glioxílico y NaBH₃CN en concentraciones 25 y 75 mM respectivamente. Esta solución se filtra de forma estéril y se incuba a 50 °C durante 48 horas para dar lugar a la BSA glicosilada (BSA-G). De igual forma, la BSA calentada sin ácido glioxílico ni NaBH₃CN se utilizó como muestra control (BSA-C). Tras la incubación, la BSA se dializa frente a agua para eliminar los restos de glucosa que no reaccionaron y las sales del tampón y finalmente se liofiliza. La cuantificación del contenido total de CML en la proteína glicosilada se realizó mediante GC-MS, utilizando ²H₈-CML como estándar interno (24). De forma resumida, la muestra se reduce con NaBH₄ y posteriormente se hidroliza con ácido clorhídrico. Los aminoácidos se transforman en sus trifluorometilésteres y se analizan por GC-MS en modo SIM.

2.2. Diseño experimental para los ensayos con animales

Los estudios con animales se realizaron de acuerdo con las directivas de la Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC) y fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Granada. Se emplearon cuatro grupos de animales que cubrían la

expresión de los dos receptores a estudiar: ratones homocigotos control Gpr43^{+/+} (129SvEvBrd, Deltagen) y RAGE^{+/+} (C57Bl/6, Lexicon Genetics Inc.) y ratones transgénicos que sufren la delección del gen que codifica dichos receptores, ratones Gpr43^{-/-} (129SvEvBrd, Deltagen) y ratones RAGE^{-/-} C57Bl/6 (Lexicon Genetics Inc.). Los animales se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y tuvieron acceso libre a una dieta standard de laboratorio y agua. El sacrificio se realizó mediante sobredosis con halotano.

En el *experimento A*, a cuatro grupos de ratones (n = 10) se les indujo una *colitis aguda* con dextrano sulfato sódico (DSS) tras haber ingerido durante 28 días una dieta enriquecida al 3% con la BSA-G o BSA-C (25). Tras este periodo, a los ratones se les administró el DSS al 4% por medio del agua de bebida durante 7 días y se les monitorizó diariamente el tipo de deposiciones y el sangrado presente en ellas. El día 7 se sacrificaron los animales, se extrajo el colon y se analizó histológicamente siguiendo procedimientos estándar. Como control se utilizaron 3 animales de cada grupo a los que no se les indujo la colitis mediante DSS.

En el *experimento B*, a los cuatro grupos de ratones (n = 10) se les indujo una *colitis crónica* con DSS (10) tras haber ingerido durante 28 días una dieta enriquecida al 3% con la BSA-G o BSA-C. Tras este periodo, a los ratones se les administró DSS al 2% (excepto a los grupos control) durante 5 días, seguidos de 5 días donde se les suministraba agua normal. Este ciclo se repitió dos veces más y los animales fueron sacrificados en el día 30. El avance de la colitis se monitorizó de igual forma que en el caso de la colitis aguda. Como control se utilizaron 3 animales de cada grupo a los que no se les indujo la colitis mediante DSS.

En el *experimento C* se estudió el efecto de la ingesta de AGEs durante un periodo largo (90 días), usando los cuatro grupos de ratones comentados anteriormente y suministrándoles una dieta enriquecida al 3% con BSA-G o BSA-C.

Para evaluar el efecto de un tratamiento anti-AGEs sobre la colitis inducida por DSS, en el experimento B tres animales de cada grupo se trataron durante 7 días con 100 μ g/dosis de exRAGE (R&D Systems Inc.) tal y como se detalla en la bibliografía (20). El exRAGE es una proteína quimérica obtenida mediante recombinación del dominio extracelular del RAGE murino (Gln 24-ALA 342, homólogo al sRAGE).

2.3. Ensayos histológicos y bioquímicos

Para evaluar el efecto de la ingesta de los AGEs sobre la orquestación de la respuesta inmune mediada por los receptores GPR43 y RAGE, estudiamos diversos signos clínicos, cambios histológicos y producción de citoquinas.



Signos clínicos: Se midió de forma diaria el peso de los animales, la consistencia de las heces y el contenido de sangre fecal. Las deposiciones de los animales se puntuaron de 0 a 4, siendo 0 las deposiciones normales y 4 las diarreicas. En cuanto al contenido de sangre fecal se analizó mediante el test Hemocult (Beckman Coulter). El índice de actividad diaria (DAI) se calculó teniendo en cuenta de forma combinada los parámetros anteriormente descritos (26).

Estudios histológicos: El daño en la mucosa colónica se puntuó de la siguiente forma: 0, sin daño; 1, daño en la mucosa solo; 2, daño en la mucosa y en la submucosa; 3, daño transmural. Una sección del colon distal, obtenido tras el sacrificio del animal, se fijó en formaldehído al 4% y se insertó en parafina. Secciones de 5 μ m se tiñeron con hematoxilina-eosina, tomando microfotografías con un microscopio equipado con cámara a 600 aumentos. El grado de infiltración de los neutrófilos se obtuvo contando todos los neutrófilos extrabasales por microfotografía. La puntuación obtenida representa la media del contenido de neutrófilos en 4 zonas aleatorias de mucosa y submucosa que proceden de tres secciones diferentes del colon descendente.

Permeabilidad de la mucosa intestinal: Se estudió el incremento de la permeabilidad en la mucosa intestinal de los distintos grupos de animales usando como sonda fluorescente la fluoresceína isotiocianato-dextrano (FD-4). Brevemente, se tomaron muestras de colon de tres animales de cada grupo ($n=3$), se cerraron mediante sutura y se llenaron con tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit (KHBB, pH 7.4). Posteriormente cada saco se suspendió en KHBB que contenía FD-4 y se incubó durante 30 minutos a 37°C bajo una atmósfera de $O_2:CO_2$ (95:5). Finalmente, se tomó una muestra de la solución serosa (donde se suspendió el saco) y mucosa (contenido del saco), se centrifugaron y se midió la intensidad de la fluorescencia. De esta forma, la permeabilidad se expresó como la capacidad de aclaramiento de la FD-4 de la capa mucosa a la serosa (27).

Mieloperoxidasa (MPO): Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es una enzima estrictamente específica de estos fagocitos. El análisis de la MPO se analizó en tres segmentos colónicos de cada animal (28). Los tejidos se homogeneizaron y centrifugaron, realizando el ensayo de la MPO usando un kit comercial (Hbt. Biotechnology).

Determinaciones de citoquinas: El contenido de $TNF\alpha$ colónico y de IL-6 e IL-10 plasmáticos se realizó mediante ELISA, usando kits comerciales para cuantificar citoquinas murinas (Cytoset kit, Biosource Internacional).

Ensayos quimiotácticos: La quimiotaxis de los neutrófilos se estudió usando cámaras transwell mediante la técnica descrita por Kawohl et al. (29). Los neutrófilos se aislaron a partir de un lavado peritoneal con suero salino estéril de ratones control, $Gpr43^{-/-}$ y $RAGE^{-/-}$ ($n=3$) 4 horas tras la administración de una solución de tioglicolato 3%. Los neutrófilos se enumeraron tras tinción de Meyer-Hemalaun. Para evaluar la acción de los AGEs (se utilizó CML como AGE patrón) sobre el receptor GPR43 se utilizó un anticuerpo monoclonal antiRAGE murino (R&D Systems Inc) para bloquear la interacción AGE-RAGE.

2.4. Análisis estadístico

Para realizar el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS ver. 15. Las medidas se realizaron al menos en triplicado y la normalidad de los datos se comprobó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Los valores P se calcularon utilizando un test de ANOVA multifactorial y el test de la t de student. Los valores de $P<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

La regulación de la respuesta inmune a nivel intestinal es muy compleja y dentro de ella juegan un papel importante los receptores RAGE y GPR43. Desde hace 5 años se está estudiando el papel que juega el RAGE sobre la permeabilidad de la mucosa intestinal, así como sobre el reclutamiento de los neutrófilos. De igual forma, recientemente se está evidenciando el papel fundamental que juega el receptor GPR43 para regular el reclutamiento de las células del sistema inmune hasta la mucosa intestinal ante determinados estímulos microbianos. Sin embargo, hasta ahora no se conoce si existe algún tipo de relación entre la actividad de ambos receptores. En este sentido, en el presente trabajo se evalúa cómo se activan dichos receptores mediante la administración de una proteína rica en AGEs y se estudia qué papel juegan en el desarrollo de la inflamación intestinal. Para ello, se utiliza un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal, ya que se disponen de ratones transgénicos comerciales que carecen de los receptores GPR43 y RAGE donde se puede inducir una colitis aguda o crónica. Así mismo, tras estudiar el efecto de los AGEs ante una situación patológica, se evalúa su efecto durante una ingesta prolongada, evaluando si dicha ingesta puede incrementar el riesgo de desarrollar la enfermedad. Finalmente, para reforzar los hallazgos encontrados se estudian los efectos de una terapia con exRAGE y propionato sobre la inflamación intestinal inducida con DSS.

3.1. Glicosilación de la BSA

Para evaluar el efecto de un consumo elevado de AGEs sobre la inflamación intestinal decidimos utilizar una BSA glicosilada. Mediante el método de glicosilación utilizado por nosotros obtuvimos unos valores de CML de 69 mg/g proteína, que son similares a los encontrados por otros autores (30). Como se adiciona un 3% de BSA a la dieta estándar de los ratones y teniendo en cuenta el consumo de éstos, se estimó la ingesta diaria de CML en 10 mg/día, aunque expresada en peso corporal llegamos 100 mg/Kg/día. La ingesta diaria de CML en humanos ha sido estimada en unos 75 mg/día (31) dando lugar a una ingesta de 1 mg/Kg/día., lo que es 100 inferior a la ingesta que realizaron nuestros ratones. De esta forma, podemos evaluar con certeza el efecto de una ingesta elevada de CML sobre la inflamación intestinal. Otros autores (21) han demostrado que la BSA glicosilada interacciona con el receptor RAGE mediante la CML, lo que refuerza la utilización de esta proteína para realizar el estudio.

3.2. Relación de los receptores RAGE y GPR43 con la ingesta elevada de AGEs en un modelo de colitis aguda

Para estudiar la relevancia de la deficiencia de los receptores RAGE y GPR43 en condiciones de inflamación aguda, así como el efecto de la ingesta elevada de AGEs, indujimos una colitis aguda mediante la administración de DSS al 4% en el agua de bebida de ratones Gpr43^{+/+}, RAGE^{+/+}, Gpr43^{-/-} y RAGE^{-/-}. Hasta el día 2 todos

los animales mostraron unos signos clínicos idénticos (peso, consistencia de las heces y sangrado rectal) lo que dio lugar a un índice de actividad diaria (DAI) similar (Figuras 1A y 1B). A partir del tercer día todos los ratones deficientes en los receptores GPR43 y RAGE (Gpr43^{-/-} y RAGE^{-/-}) perdieron peso de forma más significativa que los ratones control (Gpr43^{+/+} y RAGE^{+/+}) mientras que estos tuvieron menos diarrea y sangrado rectal ($P < 0,05$). De igual forma se puede observar que la utilización de una dieta enriquecida en AGEs (1B) no dio lugar a unos peores signos clínicos en ratones que carecían del receptor RAGE, mientras que el índice de actividad diaria fue superior ($P < 0,01$) en ratones Gpr43^{-/-}. Estos resultados concuerdan con la longitud del colon de los animales alimentados con BSA-C (1A) y BSA-G (1B), mostrando una mayor inflamación en ratones deficientes en los receptores RAGE y GPR43.

El examen histológico de las muestras obtenidas del colon descendente mostró (Figura 1E) un daño tisular reducido y una menor infiltración de los neutrófilos ($P < 0,001$) en los ratones que carecen de los receptores RAGE y GPR43 y son alimentados con una dieta rica en AGEs. Sin embargo, estas diferencias no son tan apreciables en el caso de los animales alimentados con BSA-C, no significativas en el caso del receptor RAGE y $P < 0,05$ en el caso del GPR43. Para cuantificar la cantidad de neutrófilos, realizamos también un ensayo ELISA para determinar los niveles de MPO en tejido colónico homogeneizado. Como se muestra en la figura 2B, los niveles de MPO estaban significativamente reducidos en los ratones

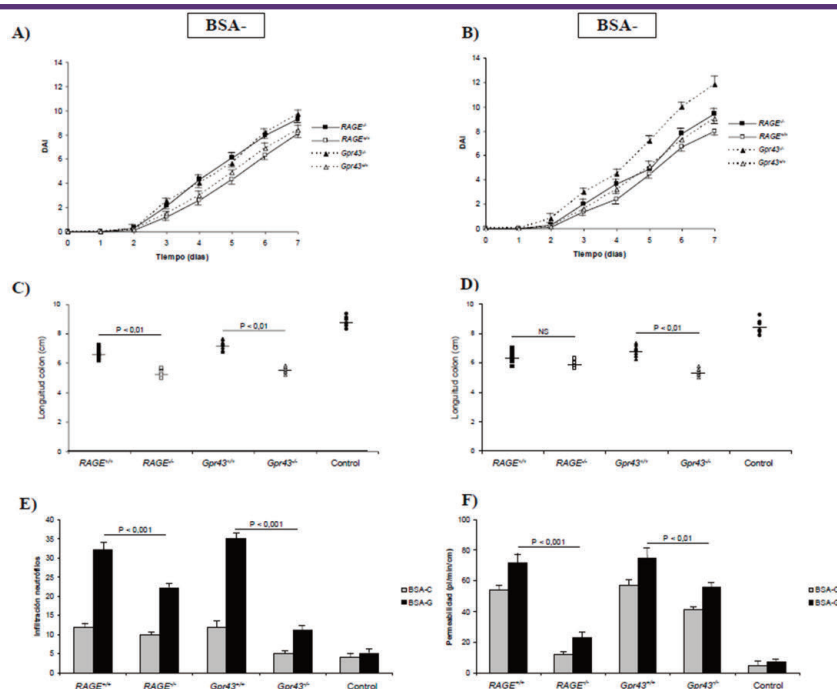


Figura 1. Signos clínicos y estudios histológicos obtenidos en animales con colitis aguda inducida. A) Índice de actividad patológica (DAI) en ratones alimentados con BSA control. B) DAI en ratones alimentados con BSA glicosilada. C) Longitud del colon en ratones alimentados con BSA control. D) Longitud del colon en ratones alimentados con BSA glicosilada. E) Infiltración de neutrófilos. F) Permeabilidad intestinal. E y F) Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,001$) excepto en los ratones RAGE^{-/-} para permeabilidad intestinal ($P < 0,05$).

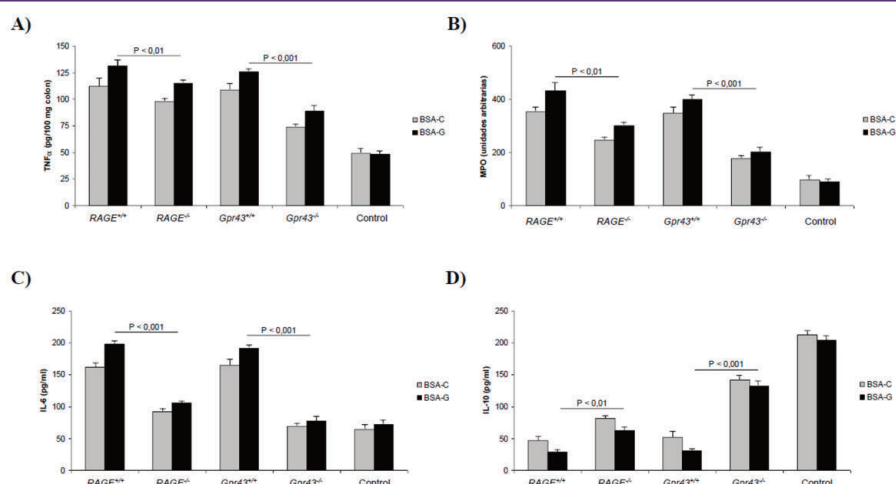


Figura 2. Parámetros bioquímicos obtenidos en animales con colitis aguda inducida. A) Niveles de TNF α colónico. B) MPO. C) Niveles de IL-6 plasmáticos. D) Niveles de IL-10 plasmáticos. A, B, C y D) Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,05$) excepto en los ratones Gpr43 $^{+/+}$ para MPO y RAGE $^{-/-}$ para IL-6 (diferencias no significativas).

RAGE $^{-/-}$ ($P < 0,01$) y Gpr43 $^{-/-}$ ($P < 0,001$). Además, la reducción de los niveles de TNF α colónicos (2A) fue más marcada en los ratones Gpr43 $^{-/-}$ ($P < 0,001$) que en los RAGE $^{-/-}$ ($P < 0,01$). Los mismos descensos se encontraron para los niveles de IL-6 plasmática (2C) mientras que los niveles de IL-10 (2D) estaban mas elevados en los ratones Gpr43 $^{-/-}$ ($P < 0,001$). Teniendo en cuenta que la IL-10 es una citoquina antiinflamatoria, mientras que la IL-6 y TNF α son proinflamatorias, se puede establecer que la inducción de una colitis aguda con DSS origina un estado proinflamatorio que da lugar a

una infiltración de neutrófilos. La utilización de una dieta rica en AGEs promueve el desarrollo de una patología más grave. Dicha infiltración e inflamación resultante es menor en los ratones que carecen del receptor GPR43, lo que indica que dicho receptor es crucial en el desarrollo de una respuesta inflamatoria temprana ante un agente externo. En este sentido, la figura 1E muestra el efecto que dicha inflamación provoca en la permeabilidad al FD4, que se considera un índice de la función barrera que ejerce el epitelio intestinal. Como se puede observar, en incremento en la permeabili-

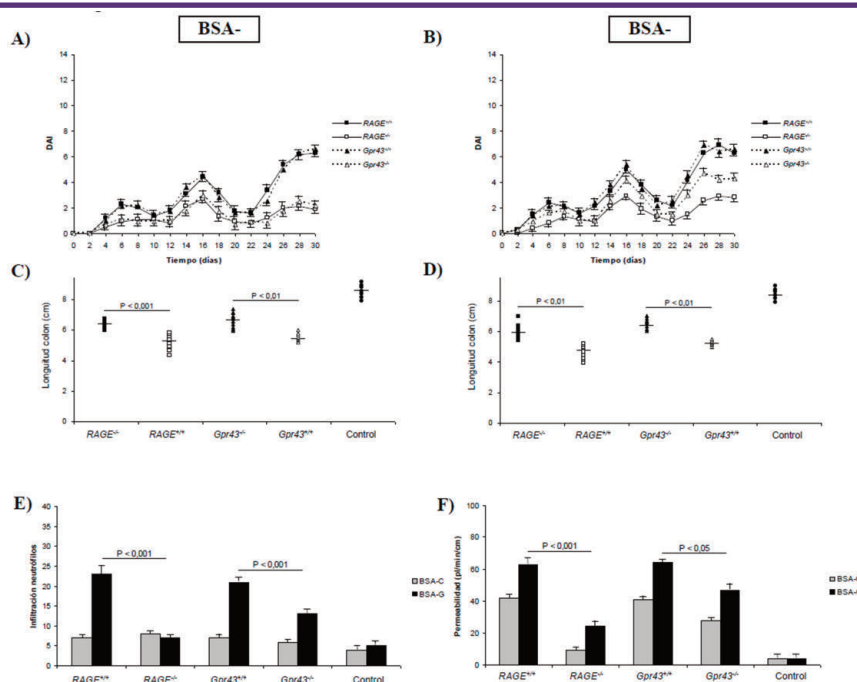


Figura 3. Signos clínicos y estudios histológicos obtenidos en animales con colitis crónica inducida. A) Índice de actividad patológica (DAI) en ratones alimentados con BSA control. B) DAI en ratones alimentados con BSA glicosilada. C) Longitud del colon en ratones alimentados con BSA control. D) Longitud del colon en ratones alimentados con BSA glicosilada. E) Infiltración de neutrófilos. F) Permeabilidad intestinal. E y F) Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,01$) excepto en los ratones RAGE $^{-/-}$ para infiltración de neutrófilos.

dad originada por la colitis no se experimentó en los ratones carentes del receptor GPR43, debido fundamentalmente al desarrollo de una menor inflamación, como se ha comentado anteriormente.

3.3. Relación entre los receptores RAGE y GPR43 con la ingesta elevada de AGEs en un modelo de colitis crónica

Para profundizar en el efecto de los receptores RAGE y GPR43 y la exposición continuada a concentraciones elevadas de AGEs sobre el proceso inflamatorio a nivel intestinal, realizamos un ensayo en el que administramos DSS al 2% durante 30 días a los distintos grupos de ratones estudiados. Como puede observarse en la figuras 3A y 3B, el índice de actividad diaria mostraba picos que coinciden con el cese de la administración del DSS. Así mismo, es evidente que la ausencia de los receptores RAGE y GPR43 protege frente a la inducción de daño intestinal, resultando en unos DAI menos elevados. Sin embargo, en el caso de la suplementación de la dieta con BSA glicosilada (Figura 3B) mostró que los ratones *Gpr43*^{-/-} desarrollaban una diarrea, pérdida de peso y sangrado rectales mas parecidos al de los ratones control (que expresaban dicho receptor), lo que sugiere que el receptor RAGE juega un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación de tipo crónico. El estudio microscópico de diferentes secciones del colon descendente mostró menos signos de inflamación de la mucosa intestinal en ratones con deficiencia en la expresión de alguno de los receptores (Figura 4). Estos resultados también se apoyan en la mayor longitud colónica en los animales transgénicos ($P < 0,01$) comparados con sus homólogos salvajes (Figuras 3C y 3D).

Como se ha comentado previamente, las preparaciones microscópicas revelaron una lesión mucosa menor en ratones *Gpr43*^{-/-} y *RAGE*^{-/-} (Figura 4) y especialmente una menor infiltración de neutrófilos (Figura 4E). Este hecho se demostró cuantitativamente por los menores valores de $TNF\alpha$ (5A) y MPO (5B) e IL-6 (5C) así como por un mayor nivel plasmático de IL-10 (5D). De esta forma, la función de barrera epitelial se vio más protegida en dichos ratones (Figura 3E), especialmente en los *RAGE*^{-/-}. En resumen, estos resultados demuestran que la deficiencia en los receptores GPR43 y RAGE dan lugar a una menor inflamación colónica en el modelo de colitis crónica inducida por DSS, dando un mayor protagonismo al receptor RAGE en el mantenimiento de la inflamación intestinal de tipo crónico. Así mismo, estos resultados apoyan la hipótesis de que los AGEs procedentes de la dieta pueden dar lugar al desarrollo y/o perpetuación de una patología inflamatoria intestinal más severa que cuando se administra una dieta normal.

3.4. Repercusión de la ingesta prolongada de AGEs sobre los receptores RAGE y GPR43

Como se ha comentado en los dos apartados precedentes, el consumo elevado de AGEs origina un cuadro inflamatorio más severo en distintos modelos de inflamación intestinal. De esta forma, nos propusimos evaluar el efecto que tiene una ingesta elevada de AGEs en animales a los que no se les induce ningún tipo de colitis. Como se puede observar en la figura 6, se obtuvo una mayor infiltración de neutrófilos ($P < 0,001$) en todos los ratones que se alimentaron durante tres meses con BSA-G, excepto en el caso de los

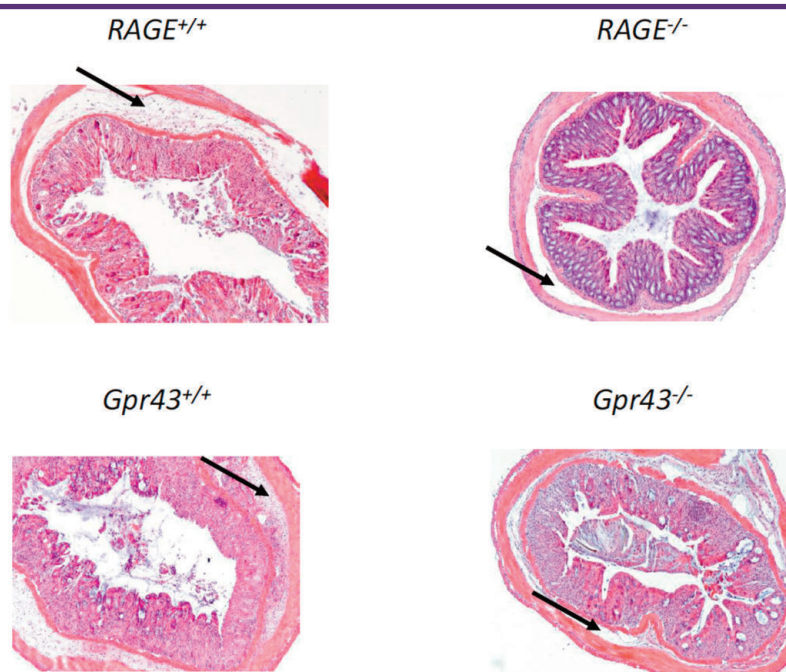


Figura 4. Microfotografías colónicas obtenidas en animales con colitis crónica inducida. Los ratones *RAGE*^{-/-} y *Gpr43*^{-/-} presentan una inflamación crónica menos severa. Las flechas indican la presencia de una cantidad diferente de neutrófilos en la zona submucosa.

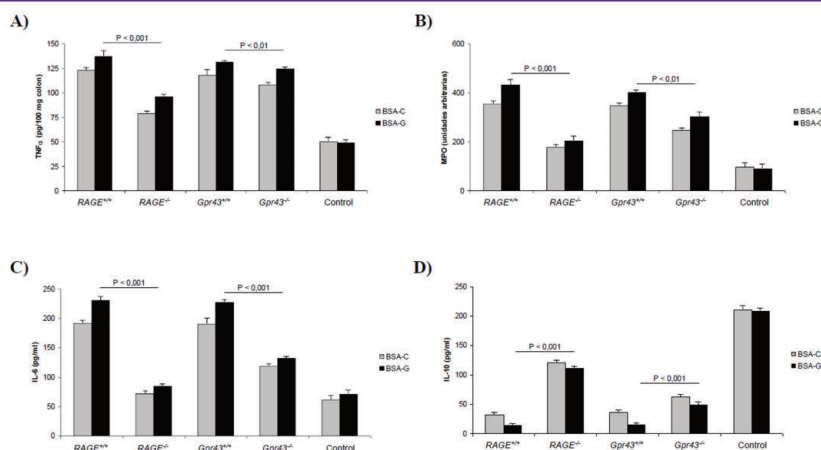


Figura 5. Parámetros bioquímicos obtenidos en animales con colitis crónica inducida. A) Niveles de TNF α colónico. B) MPO. C) Niveles de IL-6 plasmáticos. D) Niveles de IL-10 plasmáticos. A, B, C y D) Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,05$) excepto en los ratones RAGE $^{-/-}$ para MPO e IL-10 (diferencias no significativas).

ratones Gpr43 $^{-/-}$ donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Este hecho se verificó a partir del contenido colónico de MPO, que mostró una infiltración mayor en ratones alimentados con la proteína glicosilada, exceptuando a los ratones con deficiencia de los receptores RAGE y GPR43 (no significativas). Así mismo, se encontraron mayores niveles ($P < 0,01$) de TNF α colónico e IL-6 plasmática en ratones con dieta enriquecida en BSA-G (Figura 7), siendo los valores de IL-10 plasmática inferiores en estos grupos. Así, estos resultados apuntan a que la ingesta prolongada de cantidades sustanciales de AGEs da lugar a la elevación de marcadores inflamatorios.

3.5. Efecto del tratamiento con exRAGE sobre los receptores RAGE y GPR43 en un modelo de colitis crónica

Tras evidenciar que los receptores RAGE y GPR43 juegan un papel fundamental en la respuesta inmunológica ante una situación de inflamación sostenida, decidimos estudiar el efecto que puede tener una terapia de secuestro de AGEs mediante la utilización de exRAGE, que es una proteína quimérica homóloga al sRAGE

humano y que es capaz de captar AGEs libres en el medio. Para ello, se repitió el experimento de inducción de colitis crónica a ratones suplementados como BSA-G.

Como se observa en la figura 8A, el grado de infiltración de los neutrófilos en el colon descendió significativamente ($P < 0,001$) cuando se trataron ratones Gpr43 $^{+/+}$, RAGE $^{+/+}$, Gpr43 $^{-/-}$ y RAGE $^{-/-}$; en este último también se observó un descenso significativo ($P < 0,05$). Teniendo en cuenta que estos ratones carecen del receptor RAGE, el efecto beneficioso derivado de retirar un exceso de AGEs podría indicar que otros receptores como el GPR43, que están implicados en el reclutamiento de los neutrófilos, también se activan por los AGEs. De igual forma, la permeabilidad del epitelio intestinal (Figura 8B) mejoró de forma considerable ($P < 0,001$) con el tratamiento mediante exRAGE. De forma cuantitativa, la infiltración neutrofílica, medida como actividad de la MPO, disminuyó significativamente ($P < 0,001$) mediante el tratamiento con exRAGE en todos los grupos excepto en el RAGE $^{-/-}$ donde no se encontraron diferencias (Figura 9B). En cuanto a los marcadores proinflamatorios, las citoquinas TNF α (9A) e IL-6 (9C) se com-

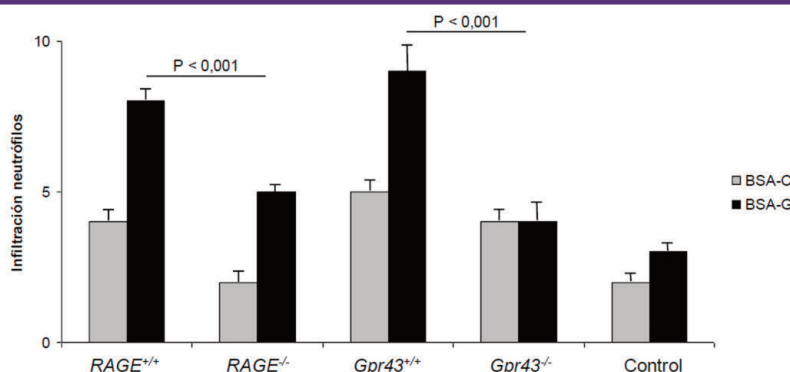


Figura 6. Infiltración de los neutrófilos en animales con una ingesta prolongada de AGEs. Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,001$) excepto en los ratones Gpr43 $^{-/-}$ (NS).

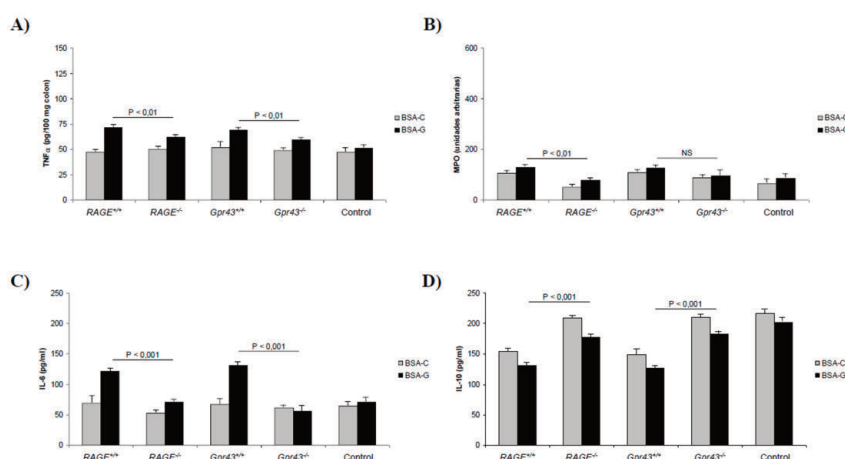


Figura 7. Parámetros bioquímicos obtenidos en animales con colitis aguda inducida. A) Niveles de TNF α colónico. B) MPO. C) Niveles de IL-6 plasmáticos. D) Niveles de IL-10 plasmáticos. A, B, C y D) Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,05$) excepto en los ratones RAGE^{-/-} y Gpr43^{+/+} para MPO y Gpr43^{-/-} para IL-6 (diferencias no significativas).

portaron de igual forma a los signos histológicos reseñados anteriormente. Finalmente, la concentración de IL-10 plasmática se incrementó de forma significativa ($P < 0,001$) con el tratamiento, indicando que la inflamación subsiguiente a la inducción de la colitis era menor (Figura 9D).

3.6. Efecto de la CML y propionato sobre la migración de los neutrófilos y su relación con los receptores RAGE y GPR43

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores indican que el receptor GPR43 podría ser estimulado por los AGEs, principalmente la CML, que es el AGE mayoritario formado en la BSA glicosilada. De esta forma, para caracterizar la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos ante los AGEs, aislamos neutrófilos a partir del lavado peritoneal de ratones de los cuatro grupos tratados previamente con tioglicolato. Para realizar el experimento utiliza-

mos una solución de CML 10-2 M, ya que ha mostrado previamente su actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos en ratones salvajes. Tras 45 minutos de estimulación, se observó un incremento significativo ($P < 0,001$ excepto en RAGE^{-/-}, $P < 0,01$) de la migración quimiotáctica en todos los grupos (Figura 10A). Es de señalar que en el RAGE^{-/-} la migración quimiotáctica debe de estar mediada por otros receptores distintos al RAGE, que no se expresa en esos neutrófilos. Para determinar si el receptor GPR43 podía activarse mediante la estimulación con CML, se utilizó un anticuerpo murino antiRAGE, que es capaz de bloquear la señal AGE-RAGE. Así, se pudo observar que en los ratones RAGE^{+/+}, Gpr43^{+/+} y Gpr43^{-/-} la migración de los neutrófilos descendió de forma significativa un 60% ($P < 0,001$) mientras que en el grupo RAGE^{-/-} no se encontraron diferencias significativas, ya que estos neutrófilos carecían del receptor RAGE. De igual forma, los valores a los que descendió la

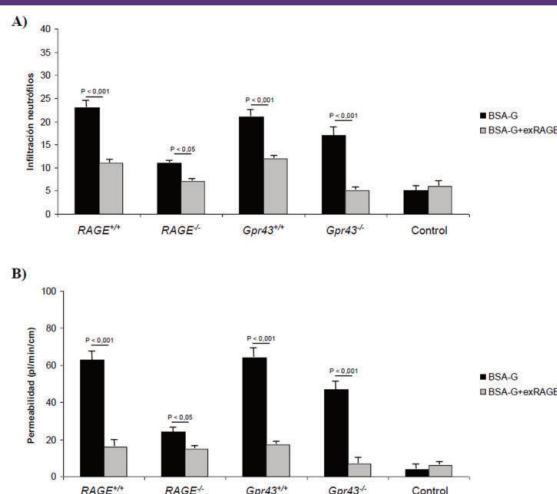


Figura 8. Signos clínicos y estudios histológicos obtenidos en animales con colitis crónica inducida y tratados con exRAGE. Las diferencias para el mismo tipo de ratón alimentados con BSA control o glicosilada son estadísticamente significativas ($P < 0,001$) excepto en los ratones Gpr43^{-/-}.

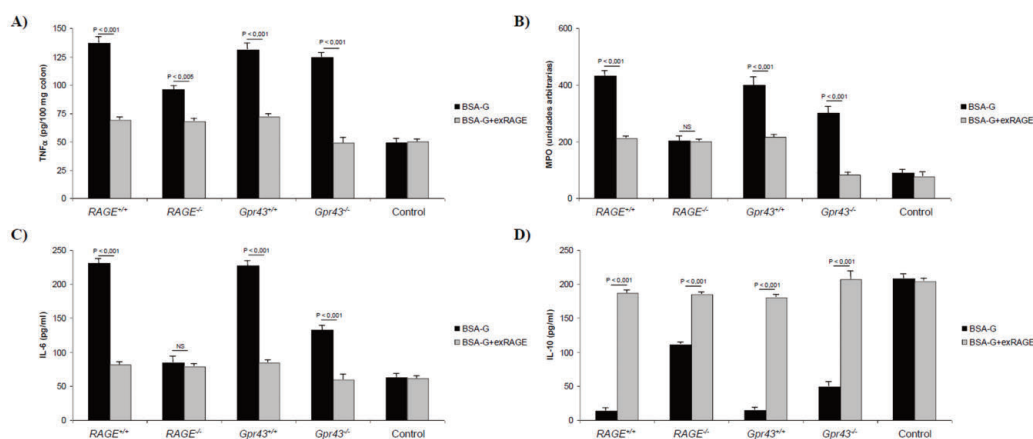


Figura 9. Parámetros bioquímicos obtenidos en animales con colitis crónica inducida y tratados con exRAGE. A) Niveles de TNF α colónico. B) MPO. C) Niveles de IL-6 plasmáticos. D) Niveles de IL-10 plasmáticos. A, B, C y D) Se trató a los ratones con BSA glicosilada. De igual forma los ratones se trataron con exRAGE para captar los AGEs libres con o sin adición de propionato, para estimular al receptor GPR43.

migración quimiotáctica fueron significativamente mayores ($P < 0,01$) en los grupos $Gpr43^{+/+}$, $RAGE^{+/+}$ y $RAGE^{-/-}$ que la quimiotaxis del grupo control. Sin embargo, en el grupo $Gpr43^{-/-}$ no se encontraron diferencias significativas entre el control y los neutrófilos tratados con CML y antiCML. Habida cuenta de que estos neutrófilos carecen de receptor GPR43, la quimiotaxis debía deberse al receptor RAGE, que resulta bloqueado por su anticuerpo. Así, las diferencias de actividad encontradas con los neutrófilos de los demás grupos cuando se añade CML y antiRAGE indican que en estos grupos la migración quimiotáctica se debía al receptor GPR43.

Para comparar la capacidad migratoria de los neutrófilos debida a los SCFA y la CML, se realizó un ensayo con neutrófilos procedentes de ratones $RAGE^{-/-}$, donde se ha demostrado previamente que la quimiotaxis se debía exclusivamente a la interacción con el receptor GPR43. Así, se ensayaron dos concentraciones dis-

tintas de CML y propionato (10-2 M y 10-4 M) que fue seleccionado como SCFA de referencia por su marcada actividad quimiotáctica (10). Como puede observarse en la figura 10B, el incremento en la concentración de CML o propionato indujo una mayor respuesta quimiotáctica, que fue aproximadamente el doble en el caso del propionato comparado con la CML. Así mismo, la co-estimulación con CML y propionato dio lugar a un incremento cooperativo en la migración de los neutrófilos.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten extraer diversas conclusiones. Uno de los principales hallazgos es que tanto el receptor GPR43 como el RAGE son necesarios para el reclutamiento de los neutrófilos en un modelo de inflamación intestinal por lesión de la barrera mucosa. Los datos obtenidos per-

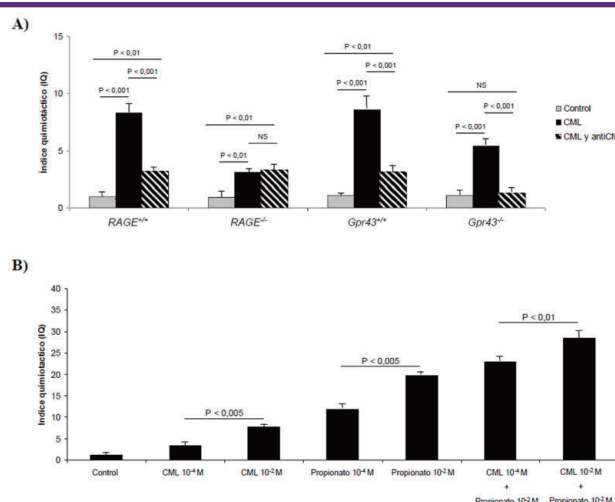


Figura 10. Efectos de CML y propionato sobre la migración de los neutrófilos. A) Efecto de la CML (10-4 M) sobre la migración de los neutrófilos procedentes de ratones $RAGE^{+/+}$, $RAGE^{-/-}$, $Gpr43^{+/+}$ y $Gpr43^{-/-}$. Se utilizó el anticuerpo monoclonal murino antiRAGE para evaluar del efecto de la CML sobre el receptor GPR43. B) Efecto de la CML y propionato sobre la migración de los neutrófilos aislados de ratones $RAGE^{-/-}$.

miten demostrar que la activación de ambos receptores juega un papel contradictorio en la fisiopatología inflamatoria a nivel intestinal: por un lado, la activación de estos receptores ejerce un factor protector frente a la traslocación bacteriana en un modelo agudo de colitis. Sin embargo, dicha activación es perjudicial en el caso de una inflamación de tipo crónico.

Hemos demostrado claramente el papel protector que ejerce la presencia de los receptores GPR43 y RAGE frente las lesiones agudas que se producen tras la exposición a una dosis elevada de DSS. La activación del receptor GPR43 permite el reclutamiento de los neutrófilos, con la consiguiente elevación de la citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6 y la disminución de la IL-10 (citoquina antiinflamatoria). Un comportamiento similar, pero menos potente se ha observado con el receptor RAGE. La ausencia de este receptor da lugar al desarrollo de una patología ligeramente mas severa que en los ratones control, pero la ausencia del receptor GPR43 dio lugar a una evolución clínica peor, lo que está en consonancia con estudios realizados por otros investigadores (10, 25). Esto parece indicar que el receptor RAGE no puede compensar la ausencia del GPR43 y que este es estrictamente necesario para iniciar el proceso inflamatorio. Por un lado, Sina et al. (10) han demostrado que las señales inducidas por los SCFA a través del receptor GPR43 actúan *in vivo* como el interruptor maestro para poder alcanzar el umbral crítico ante otros estímulos. Así, la ausencia de este receptor retardaría el desarrollo del proceso inflamatorio mediado por otros receptores como el RAGE. Por otro lado, el receptor RAGE podría actuar a más largo plazo, como se demuestra en los problemas a largo plazo derivados de la diabetes (32).

En cuanto al modelo de colitis crónica, hemos podido demostrar claramente el papel protector que juega la deficiencia de los receptores GPR43 y RAGE frente a las lesiones crónicas genera-

das tras varios ciclos de administración de una dosis baja de DSS. Los ratones transgénicos deficientes en estos receptores exhibieron una inflamación menor de la mucosa, tal y como indicaban los signos clínicos, histología y niveles de citoquinas anti- y proinflamatorias. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sina et al. (10) mientras que otros autores (25) defienden que la presencia del receptor GPR43 protege del desarrollo de una inflamación crónica. Nuestros resultados, junto con los de otros grupos apuntan a que estos receptores juegan un papel perjudicial en la inflamación crónica. La activación de estos receptores provocaría la migración hacia el intestino de cantidades crecientes de neutrófilos. Por un lado, uno de los efectos fundamentales que ejercen los neutrófilos en la inflamación intestinal es la regulación a la baja de las proteínas de unión intercelular en el epitelio intestinal. Así, una infiltración sostenida de los neutrófilos podría contribuir a la disminución de la función barrera de dicho epitelio (33). Por otro lado, diversos autores han encontrado tanto en células Caco-2 (22) como en el colon (20) la permeabilidad de la mucosa se altera por activación del receptor RAGE. Esta hipótesis explicaría porqué aumenta la permeabilidad intestinal en los ratones RAGE^{+/+} y Gpr43^{+/+} en el modelo de inflamación crónica, a la vez que aumenta el número de neutrófilos infiltrados en la mucosa intestinal.

Es importante señalar que, si bien la actividad del receptor RAGE no parece ser fundamental en el inicio de la actividad inflamatoria, su papel en el posterior mantenimiento de este status parece ser importante. La unión AGE-RAGE daría lugar a la aparición de diversos efectos mediados por la activación celular (22):

- 1) Atracción quimiotáctica de los neutrófilos por regulación al alza de receptores de adhesión endotelial y su unión al mismo receptor RAGE, que también actúa como receptor de adhesión.
- 2) Producción elevada de citoquinas proinflamatorias.

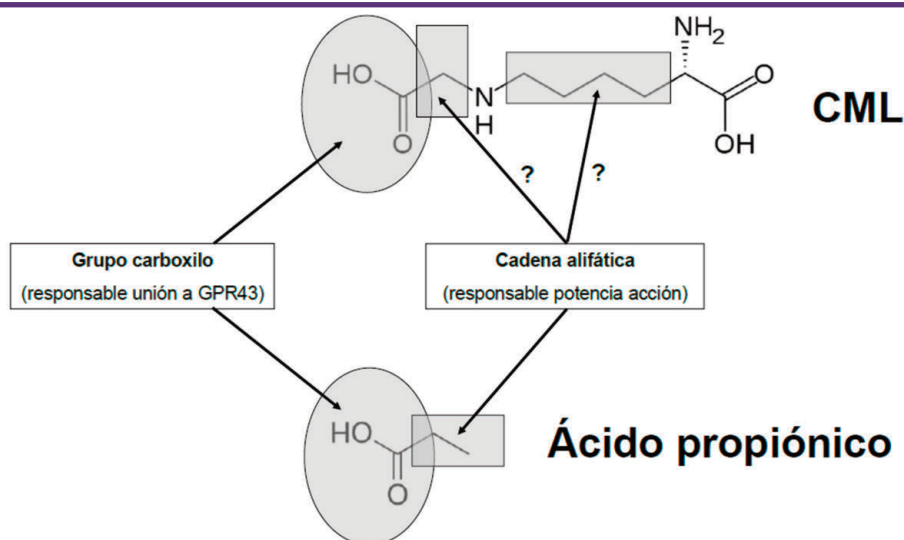


Figura 11. Posible explicación de la afinidad de la CML por el receptor GPR43 teniendo en cuenta las semejanzas en la estructura química con el ácido propiónico.



De forma general se especula que los AGEs puedan ser un "factor de riesgo" para la salud humana (34, 35). Estos autores indican que la absorción de los AGEs procedentes de los alimentos es de un 10% y de acuerdo con estudios cinéticos un tercio de los mismos se eliminan por vía renal. Por tanto, una alta proporción es retenida, aunque no está claro cuál de los compuestos de Maillard de la dieta activan la vía proinflamatoria después de su absorción y si los organismos sanos compensan el efecto fisiopatológico. En este sentido, **otra de las conclusiones que se derivan del presente trabajo es que los AGEs ingeridos con la dieta promueven la aparición de un desequilibrio en el balance inflamatorio a nivel intestinal, originando un status proinflamatorio** que podría dar lugar a la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal en aquellos individuos con susceptibilidad genética o sometidos a otro tipo de estímulos ambientales o microbianos. Por un lado, hemos demostrado que el consumo elevado de AGEs promueve la activación del sistema inmune de la mucosa en presencia de una barrera mucosa dañada, contribuyendo al desarrollo de la EII. Por otro lado, hemos observado que la ingesta elevada de AGEs durante un tiempo prolongado da lugar a una serie de cambios, como infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal o elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias, que podría predisponer al desarrollo de una patología posterior.

Otro descubrimiento importante del presente trabajo es la demostración de que la CML es capaz de estimular el receptor GPR43. De esta forma los AGEs, en concreto la CML, no solo actuarían como quimioattractores de los neutrófilos de una forma indirecta mediante su interacción con el receptor RAGE, sino que podrían actuar de forma directa tal y como los SCFA hacen. Los agonistas naturales del receptor GPR43 son los ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato o butirato (36), aunque recientemente se han sintetizado diversos compuestos artificiales, fenilacetamidas, con una mayor actividad sobre este receptor (37). En este sentido, mediante la utilización de neutrófilos obtenidos a partir de ratones transgénicos, hemos demostrado por primera vez que la CML es capaz de unirse al receptor GPR43 y activarlo, promoviendo la migración quimiotáctica de los neutrófilos. Los SCFA interactúan con el GPR43 por medio de grupo carboxilato tal y como muestra la figura 11 (39). Este grupo con carga negativa se uniría a los grupos catiónicos de la arginina 5.39 y 7.35 (40). Así, la CML podría unirse al GPR 43 mediante el grupo carboxílico en la posición ϵ , ya que el que está presente en la posición ϵ es el que se utiliza para realizar el enlace peptídico en la proteínas (Figura 11). Respecto a la potencia de la CML, se observó que es aproximadamente del 30 al 40% de la que ejerce el propionato. En los SCFA la potencia de acción depende de la longitud de la cadena alifática, pero en el caso de la CML no hemos realizado experimentos para determinar si su

actividad depende de las cadenas señaladas en la figura 10, aunque posiblemente, debido a la homología estructural con las fenilacetamidas, el grupo N^ϵ y el carboxilo anexo podrían ser los responsables. También es de destacar la actividad cooperativa que existe entre la CML y el propionato, que dieron lugar a un incremento notable en la migración de los neutrófilos. Un comportamiento similar se ha encontrado entre el propionato y el quimioattractante de los queratinocitos (10) y el propionato y las fenilacetamidas (38).

Finalmente, habida cuenta del papel que juegan los AGEs en crear las condiciones propicias para el desarrollo de un brote agudo de la EII o de la perpetuación de una inflamación crónica, el tratamiento con sRAGE podría ser una terapia prometedora para el tratamiento de esta patología. La administración de sRAGE en el modelo de colitis crónica mejoró tanto los signos clínicos de la enfermedad como los parámetros bioquímicos e histológicos. Unos resultados similares se han obtenido al utilizar sRAGE para prevenir las alteraciones que se producen en la barrera epitelial en experimentos de isquemia-reperfusión (20). Como se ha comentado antes, una ingesta elevada de AGEs produce una patología más grave y podría facilitar el desarrollo de la EII si se ingieren en cantidades elevadas durante un tiempo prolongado. De igual forma hemos comentado la actividad agonista de la CML sobre el receptor GPR43. Así, quelación de los AGEs podría ser una forma prometedora de inhibir la migración de los PMN o la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias al proyecto europeo Stance4Health (Contrato N° 816303) financiado por la European Research Commission (Research Executive Agency) cuyo Coordinador es el Dr. José Ángel Rufián Henares.

Abreviaturas

AGEs: Compuestos avanzados de glicosilación
BSA-C: Álbmina sérica bovina control.
BSA-G: Álbmina sérica bovina glicosilada.
BSA: Álbmina sérica bovina.
CML: carboximetilisina
DAI: Índice de actividad diaria.
DSS: dextrano sulfato sódico.
EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
GC-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

GPR43: Receptor acoplado a la proteína G43

IL-10: Interleukina 10.

IL-6: Interleukina 6.

MPO: Mieloperoxidasa.

NF κ B: Factor nuclear de transcripción kappa-beta.

NOS: Radicales del nitrógeno

RAGE: Receptor para los compuestos avanzados de glicosilación

ROS: Radicales del oxígeno

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

SIM: Single Ion Monitoring.

sRAGE: Fracción soluble del receptor RAGE

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

5. REFERENCIAS

- Royero HA. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2003, 18(1): 20-6.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998, 115: 182-205.
- Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2002, 359: 331-40.
- Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *American Journal of Gastroenterology*. 1997, 92: 5S-11S.
- Mills DJS, Tuohy KM, Booth J, Buck M, Crabbe MJC, Gibson GR, Ames JM. Dietary glycated protein modulates the colonic microbiota towards a more detrimental composition in ulcerative colitis patients and non-ulcerative colitis subjects. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105: 706-14.
- Higa A, McKnight W, Wallace JL. Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *European Journal of Pharmacology*. 1993, 239: 171-76.
- MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*. 1996, 31: 907-16.
- Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1996, 31: 132S-48S.
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiva H, Iwanaga T, Furnes JB, Kuwahara A. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Research*. 2006, 324: 353-60.
- Sina C, Gavrilova O, Förster M, Till A, Derer S, Hildebrand F, Raabe B, Chalaris A, Scheller J, Rehmann A, Franke A, Ott S, Häslér R, Nikolau S., Fölsch UR, Rose-John S, Jiang HP, Li J, Schreiber S, Rosenstiel P. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *Journal of Immunology*. 2009, 183: 7514-22.
- Chadwick VS, Anderson RP. Inflammatory Products of Commensal Bacteria and Gastro-Intestinal Disorders. *Digestive Diseases*. 1990, 8: 253-68.
- Reif S, Klein I, Lubin M. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997, 40: 754-60.
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut*. 2004, 53:1479-84.
- Serra-Majem L, Ribas L, Ngo de la Cruz J, Ortega RM. Alimentación, jóvenes y dieta mediterránea en España. Desarrollo del KIDMED, índice de calidad de la dieta mediterránea en la infancia y adolescencia, En: Serra Majem L, Aranceta Bartrina J. (Eds.), Alimentación infantil y juvenil, Estudio Enkid Masson, Barcelona, España, 2002, pp. 51-59.
- Seiquer I, Mesías M, Muñoz-Hoyos A, Galdó G, Navarro MP. Mediterranean Dietary Style Improves Calcium Utilization in Healthy Male Adolescents. *Journal of the American College of Nutrition*. 2008, 27: 454-62.
- Rufián-Henares JA, Morales FJ. Functional properties of melanoidins: *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*. 2007, 40: 995-1002.
- Nass N, Bartling B, Navarrete-Santos A, Scheubel R, Börgemann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitung Gerontology Geriatrics*. 2007, 40: 349-56.
- Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*. 2003, 23:129-34.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*. 2005, 83: 876-86.
- Raman, KG, Sappington PL, Ryan RY, Levy M, Prince JM, Liu S, Watkins SK, Schmidt AM, Billiar TR, Fink MP. The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal barrier dysfunction after haemorrhagic shock. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 2006, 291: G556-65.
- Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, Schmidt AM, Stern DM, Al-Mohanna FA. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *Journal of Leukocyte Biology*. 2002, 71: 433-44.
- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du-Yan S. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for RAGE that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274: 31740-9.
- Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry*. 2004, 324: 68-78.
- Charissou A, Ait-Ameur L, Birlouez-Aragon I. Evaluation of a gas



- chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples *Journal of Chromatography A*. 2007, 1140: 189-94
25. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Heidi DY, Schilter C, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemottractant receptor GPR43. *Nature*. 2009, 461: 1282-87.
26. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 α -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2001, 98: 13249-54.
27. Watkins RL, Delude F, Yang R, Gallo DJ, Baust JJ, Uchiyama T. Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to haemorrhagic shock. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 2002, 283: 212-21
28. Vieira AT, Pinho V, Lepsch LB, Scavone C, Ribeiro IM, Tomassini T, Ribeiro-dos-Santos R, Soare M., Teixeira M, Souza DG. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*. 2005, 146: 244-51.
29. Kawohl G, Szperalski B, Schroder JM, Christophers E. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in psoriasis: enhancement by self-activated serum. *British Journal of Dermatology*. 1980, 103: 527-33.
30. Buetler TM, Leclerc E, Baumeyer A, Latado H, Newell J, Adolfsson O, Parisod V, Richoz J, Maurer S, Foata F, Piguat D, Juno S., Heizmann CW, Delatour T. N^ε-carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind to RAGE and activate an inflammatory response. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2008, 52: 370-8.
31. Henle T. AGE in foods: do they play a role in uremia? *Kidney International*. 2003. Suppl 84: S145-S147.
32. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001, 44: 129-46.
33. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *American Journal of Pathology*. 2001, 159: 2001-9.
34. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1997, 94: 6474-9.
35. He C, Sabol J, Mitsuhashi T, Vlassara H. Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes*. 1999, 48: 1308-15.
36. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278: 11312-9.
37. Lee T, Schwandner R, Swaminath G, Weiszmann J, Cardozo M, Greenberg J, Jaekel P, Ge H, Wang Y, Jiao X, Liu J, Kayser F, Tian H, Li Y. Identification and Functional Characterization of Allosteric Agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. *Molecular Pharmacology*. 2008, 74: 1599-609.
38. Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milenkovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Analytical Biochemistry*. 2005, 338: 201-15.
39. Smith NJ, Stoddart LA, Devine NM, Jenkins L, Milligan G. The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284: 17527-39.
40. Sum CS, Tikhonova IG, Neumann S, Engel S, Raaka BM, Costanzi S. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282: 29248-55.

Si desea citar nuestro artículo:

Regulación de la respuesta inflamatoria intestinal mediante la ingesta de compuestos de Maillard y su interacción con los receptores RAGE y GPR43

Silvia Pastoriza y José Ángel Rufián-Henares

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 141 - 154

DOI: <http://>

RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL DE UNA B-LACTAMASA Y COMPARATIVA CON SUS HOMÓLOGOS ACTUALES

ANCESTRAL RECONSTRUCTION OF A B-LACTAMASE AND COMPARISON WITH ITS EXTANT PROTEINS

Gonzalo Fernández Balaguer, Carmen del Águila, Carolina Hurtado Marcos y Rubén Agudo Torres

Facultad de Farmacia: Universidad San Pablo CEU

corresponding author: gonzalofernandezbalaguer@gmail.com

ARTÍCULO

RESUMEN

Las β -lactamasas son proteínas de origen bacteriano que se caracterizan por hidrolizar los antibióticos β -lactámicos, confiriendo resistencia microbiana ante estos. Son una familia heterogénea de proteínas muy relevantes desde el punto de vista sanitario debido a la facilidad que presentan para adquirir resistencia a nuevos fármacos por su alta capacidad de evolución.

La evolución *in vitro* de estas proteínas ha servido, no solo para desarrollar su caracterización y mejorar su conocimiento, sino como una nueva línea de investigación que permite identificar de manera predictiva residuos implicados en la adquisición de resistencia frente antibióticos.

Al mismo tiempo, el método de reconstrucción ancestral de proteínas se ha revelado como una herramienta novedosa y útil para comprender la evolución de las β -lactamasas y entender algunas de sus características como es su promiscuidad.

En este trabajo, se ha realizado un estudio de β -lactamasas ancestrales reconstruidas a partir de la filogenia de β -lactamasas existentes de clase A. De las cuatro proteínas ancestrales estudiadas, se ha obtenido una que es funcional y se ha comparado su actividad hidrolítica con la de cuatro de sus homólogos actuales frente a ocho fármacos β -lactámicos. Se ha comprobado que esta proteína ancestral tiene una actividad frente a antibióticos más generalista que cualquier de las proteínas actuales estudiadas. Además, la proteína ancestral activa mostró más resistencia frente a uno de los fármacos utilizados que el resto de β -lactamasas existentes. Finalmente se han discutido estos resultados y a partir de ellos se argumenta por qué las secuencias ancestrales reconstruidas pueden ser un punto de partida muy atractivo a la hora de realizar evolución dirigida de proteínas para la obtención de proteínas de interés biotecnológico.

ABSTRACT

The β -lactamases are proteins of bacterial origin that are characterized by hydrolyzing antibiotics β -lactams, conferring microbial resistance against them. They are a heterogeneous family of proteins very relevant from a health point of view due to the ease they present to acquire resistance to new drugs due to their high capacity for evolution.

*The *in vitro* evolution of these proteins has served not only to develop their characterization and improve their knowledge, but as a new line of research that allows to predictively identify residues involved in the acquisition of antibiotic resistance.*

At the same time, the method of ancestral protein reconstruction has been revealed as a novel and useful tool to understand the evolution of β -lactamases and understand some of their characteristics such as their promiscuity. In this work, a study of ancestral β -lactamases reconstructed from the phylogeny of existing class A β -lactamases has been carried out. Of the four ancestral proteins studied, one has been obtained that is functional and has compared its hydrolytic activity with that of four of its current counterparts against eight β -lactam drugs. This ancestral protein has been shown to have a more generalistic antibiotic activity than any of the current proteins studied. In addition, the active ancestral protein showed more resistance to one of the drugs used than the rest of β -lactamases existing. Finally these results have been discussed and from them it is argued why reconstructed ancestral sequences can be a very attractive starting point when it comes to direct evolution of proteins for obtaining proteins of biotechnological interest.

Palabras Clave:

Antibióticos betalactámicos
Resistencia a antibióticos
Reconstrucción ancestral de proteínas
Beta-lactamasas de espectro extendido

Keywords:

Betalactams
Antibiotic resistance
Ancestral protein reconstruction
Extended spectrum
Beta-lactamases



1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de Los β -lactámicos surge con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, cuando varias placas que contenían colonias de *Staphylococcus* se encontraban contaminadas por un moho, actualmente caracterizado como *Penicillium notatum* (1). A pesar de los esfuerzos realizados por Fleming para conseguir concienciar al mundo científico de la necesidad de aislar el compuesto no es hasta 1940 cuando Howard Florey y Ernest Chain publican un método para poder purificar la penicilina de manera eficaz para ser utilizada en medicina clínica (2). Este suceso marcó un antes y un después en el desarrollo de la humanidad. A partir de este momento, desde un punto de vista científico, numerosos grupos se interesan por los β -lactámicos, intentando entender su mecanismo de acción para poder realizar modificaciones que mejoraran su actividad terapéutica. Por otro lado, a nivel médico, se comienzan a utilizar este grupo de antibióticos como una herramienta eficaz en la lucha contra las enfermedades microbianas, destacando el papel sanitario que tuvieron durante la 2ª Guerra Mundial (3).

Actualmente estos compuestos son muy utilizados debido a diferentes características antibióticas como su heterogeneidad, su amplio espectro y su gran poder bactericida. Tanto es así que, según datos de la OMS, el 63,8% de todos los antibióticos que se consumieron cada día en España durante 2015 fueron β -lactámicos (4). Históricamente, este tipo de antibióticos se han dividido en cinco subgrupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas. Todos ellos se caracterizan por tener una estructura química compuesta por una amida cíclica muy reactiva, a la que se denomina anillo β -lactámico, que sufre diferentes modificaciones para dar lugar a los distintos subgrupos mencionados anteriormente (5).

El mecanismo de acción de la mayoría de los antibióticos β -lactámicos consiste en la inhibición de la formación de la pared celular bacteriana. En concreto, impiden la correcta formación del peptidoglucano, componente esencial del espacio periplasmático que confiere rigidez a la célula a la vez que la protege del estrés osmótico interior (6). Esta molécula se forma mediante el entrecruzamiento de largas cadenas de glúcidos (N-acetilmurámico, NAM, y N-acetilglucosamina, NAG), también conocidas como cadenas de mureína, entrelazadas mediante pentapéptidos, conformando una estructura en forma de malla. Cabe destacar que los pentapéptidos se encuentran unidos al glúcido NAM y se caracterizan por ser estructuralmente diferentes entre las especies bacterianas. La estructura general del péptido se caracteriza por tener una Alanina en 1ª posición, exceptuando algunas especies que en su lugar contienen Glicina o Serina. En 2ª posición una Glutamina común para todas

las bacterias. La 3ª posición que conforma el péptido es la más variada y dependiendo de la especie se pueden identificar un tipo u otro de aminoácidos, en general, las gram negativas se caracterizan por tener m-DAP (ácido meso-diaminopimelico), mientras que las gram positivas suelen tener D-Lisina. Los aminoácidos en la 4ta y 5ta posición generalmente son dos D-Alanina y suelen añadirse de forma conjunta en forma de dímero que se une al tripéptido (7).

El último paso esencial en la formación de un peptidoglucano estable y funcional es el proceso denominado "cross-linking", donde las cadenas de glúcidos se unen unas a otras dando lugar a una conformación biológicamente funcional. En este paso, es necesario que unas transpeptidasas y carboxypeptidasas, pertenecientes al grupo de proteínas PBPs (penicillin-binding proteins), se encarguen de realizar la unión de dos cadenas de mureína (8). En el caso de las bacterias gram-negativas, estas PBPs conectan dos cadenas adyacentes realizando un enlace peptídico entre la penúltima D-Alanina del péptido de una de las cadenas y el m-DAP del péptido adyacente, a la vez que una D-Alanina carboxypeptidasa se encarga de eliminar el último aminoácido del primer pentapéptido (Figura 1). Asimismo, en gram-positivas, ocurre un proceso similar, en el que, en vez de un enlace peptídico, se forma un puente peptídico (formado por 5 glicinas) entre la penúltima D-Alanina de una cadena y el 3º aminoácido perteneciente al pentapéptido de la cadena adyacente. En conclusión, se crea un peptidoglucano estable debido a la unión de dos cadenas de mureína a nivel de sus pentapéptidos (9, 10).

Según la teoría más aceptada que Tipper y Strominger desarrollaron en 1965, los β -lactámicos, en especial la penicilina, forman una estructura tridimensional muy similar a la conformación que adoptan los aminoácidos terminales (D-Ala-D-Ala) del pentapéptido, pudiendo ser esta la razón de la inhibición de las PBPs (11). Investigaciones más recientes demuestran que la inhibición de distintas PBPs puede dar lugar a diferentes situaciones dentro de la célula, como: la lisis celular por la activación de unas proteínas denominadas autolisinas que se encargan de destruir el peptidoglucano mal formado; La inhibición de la división celular, debido a la inestabilidad periplásmica; la filamentación de la célula (protuberancias que aparecen en la célula e impiden su correcto funcionamiento (12).

Además, dentro del amplio grupo de los β -lactámicos, existe un subgrupo denominado "inhibidores de las β -lactamasas". Este se compone de una serie de moléculas con estructura similar a los β -lactámicos, pero cuya función, en vez de ser antimicrobiana es la de inhibir el funcionamiento de las enzimas bacterianas (mediante una unión no competitiva al sitio activo) que se encargan de desactivar los antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas son las β -lactamasas (13).

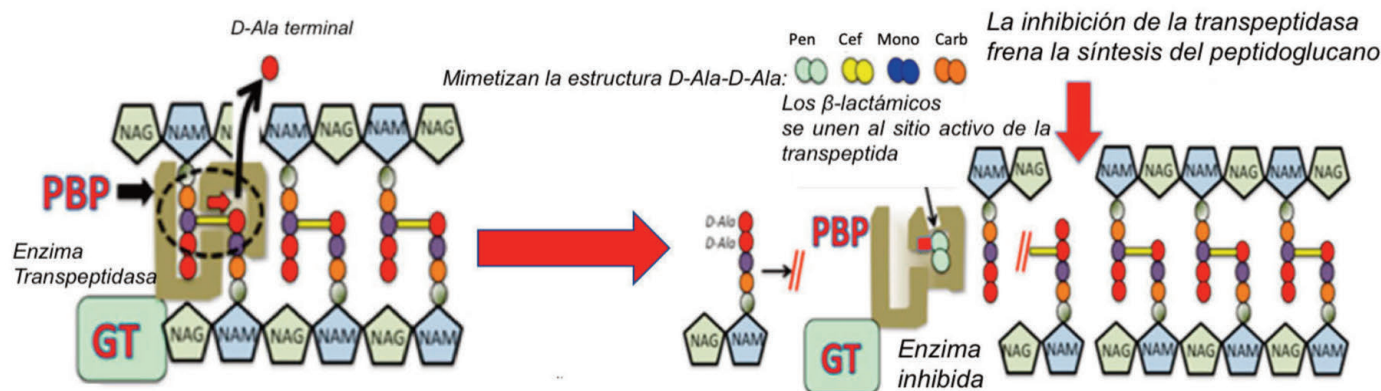


Figura 1: Formación de la pared celular mediante la actuación de una PBP (izquierda). Inhibición de la formación del peptidoglucano por la acción de distintos tipos de β -lactámicos que se unen al sitio activo de la enzima mimetizando los dos últimos aminoácidos (D-Ala-D-Ala) del pentapéptido. (derecha). Figura Modificada de Usman Umar Zango, Munir Ibrahim et al. 2019.

Las β -lactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos β -lactámicos mediante dos tipos diferentes de acción hidrolítica. El primer gran grupo son las β -lactamasas con serina que hidrolizan el anillo β -lactámico y que contienen una secuencia de aminoácidos muy variada entre ellas, pero un centro catalítico muy conservado con una serina responsable de la catálisis (14). El segundo grupo se caracteriza por catalizar la reacción de hidrólisis mediante la utilización de iones de zinc que se encuentran en los sitios activos de estas enzimas, y que por su mecanismo de acción se denominan MBLs del inglés *metallo-beta-lactamases* (15).

Estos dos grandes grupos, se dividen en 4 clases diferentes de β -lactamasas (A, B, C y D) según la clasificación de Ambler (16). Esta clasificación se basa en la homología o similitud de las secuencias de aminoácidos, donde las enzimas de los grupos A, C y D son β -lactamasas que presentan una serina catalítica, mientras que las del grupo B utilizan iones metálicos para realizar la catálisis (17). Sin embargo, la clasificación de las β -lactamasas más utilizada en el diagnóstico de infecciones es la de Bush-Jacoby-Medeiros (18). El uso popular en medicina clínica de esta clasificación se debe a los criterios utilizados en la misma para identificar cada proteína: Primero, las β -lactamasas se agrupan dependiendo de que agente es el que produce su inhibición (ácido etilendiaminotetraacético, el ácido clavulánico, etc.) y, en segundo lugar, se agrupan de acuerdo con su capacidad y eficacia a la hora de hidrolizar distintos compuestos β -lactámicos (19).

La diversificación de las β -lactamasas es un evento reciente que surge como un mecanismo de defensa bacteriano ante la alta presión terapéutica ejercida por el uso popular de los β -lactámicos sintéticos o semi-sintéticos en diversos sectores como la medicina, la ganadería, la cosmética o la agricultura. Sin embargo, se han encontrado genes de resistencia en sedimentos de permafrost con más de 30,000 años (20) y se estima el origen de

las β -lactamasas en más de 2000 millones de años (21).

En 2018 se habían descrito más de 2.770 β -lactamasas. A lo largo de los últimos 20 años, desde el año 2000 hasta 2018, el número de nuevas β -lactamasas identificadas ha aumentado un 500% con respecto a las que se habían caracterizado en el periodo anterior desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 (22). En todos estos estudios se destaca que las β -lactamasas son el principal mecanismo de resistencia que presentan las bacterias frente a los antibióticos β -lactámicos.

En relación con este tema, cabe resaltar que, en Europa, el coste total debido al aumento de la resistencia a los antibióticos, en términos de hospitalización y pérdida de producción laboral, se estima en 1,500 millones de euros cada año (23). Además, la OMS publicó en 2019 un informe realizado por la *Interagency coordination group* en el que se estima que para 2030, los costes debido a la resistencia microbiana podrían llevar a 24 millones de personas a la pobreza extrema en el mundo. Por otro lado, la resistencia a antibióticos no produce solamente un problema económico, sino que la OMS resalta que en 2019 hubo 700.000 muertes debido a enfermedades infecciosas resistentes y estima que para 2050 la resistencia microbiana a antibióticos provocará 10 millones de muertes cada año (24). Por ende, se hace incuestionable la necesidad de estudiar estas proteínas para poder luchar contra ellas y así disminuir este coste sanitario y económico. Más aún, cuando se conoce que la aparición de resistencia a un nuevo antibiótico ocurre a los 3 años de su aprobación por los organismos reguladores (25). Siendo esta una de las principales razones por las que la industria farmacéutica solamente consiguió sacar al mercado 12 nuevos antibióticos en el periodo comprendido entre 1999 y 2014 (26).

Una de las posibles soluciones planteadas ante esta situación de emergencia ha sido la reestructuración y limitación del uso de estos fármacos para intentar frenar el aumento de



resistencias, sin embargo, se ha demostrado que aunque se reduzca el número de prescripciones de antibióticos, no se consigue reducir la resistencia, sino que en algunos casos incluso se puede aumentar, como fue el aumento de bacterias nosocomiales súper resistentes, debido a su uso necesario en un lugares muy concretos y de manera continuada (27). Por lo tanto, parece necesario comprender las características biológicas de las β -lactamasas, desde el origen de su promiscuidad hasta su alta capacidad para evolucionar ante el estrés, para poder prever que tipo de mutaciones sufrirán los genes de resistencia ante el uso continuo de un fármaco o ante los nuevos fármacos que pudieran salir al mercado (28).

En este sentido, el grupo del profesor Barry G. Hall ha descrito un modelo de evolución dirigida de proteínas que mimetiza la evolución natural en el laboratorio utilizando como objeto de estudio el gen TEM-1 que codifica para una β -lactamasa que hidroliza penicilinas y algunas cefalosporinas (29). Una de las conclusiones de este estudio resaltaba que a la hora de predecir futuras mutaciones de un linaje uno de los métodos más efectivos es mimetizar la evolución natural mediante una evolución *in vitro* de proteínas ancestrales reconstruidas.

La reconstrucción ancestral de proteínas (*Ancestral Sequence Reconstruction*, o ASR), es una técnica basada en la obtención de proteínas del pasado utilizando una combinación de herramientas filogenéticas y de biología molecular. Su uso principal es poder estudiar en el laboratorio la evolución natural de una familia de proteínas y deducir su futuro linaje a través del análisis y detección de los cambios estructurales que ha tenido que sufrir un gen para dar lugar a sus homólogos actuales (30). El estudio y caracterización de estas proteínas ha permitido, por ejemplo, comprender características como la relación existente entre la secuencia de aminoácidos de una proteína y su posible función, así como descifrar posibles características proteicas (estabilidad a altas temperaturas, promiscuidad, etc.) inferidas por el estrés medioambiental de hace millones de años (31).

El proceso de obtención de una proteína ancestral consta de una serie de pasos:

a) Hacer un alineamiento de múltiples β -lactamasas actuales homólogas a partir de las cuales quiera inferirse su secuencia ancestral. Estas secuencias se obtienen de bases de datos como UniProt o NCBI; b) Estimar la filogenia de estas secuencias mediante algún método de inferencia estadístico como la máxima parsimonia, la máxima verosimilitud o la inferencia bayesiana (MP, ML e IB, respectivamente); c) generar la secuencia más probable para cada nodo del árbol filogenético; d) Producir y expresar la proteína codificada por la secuencia ancestral seleccionada (31). Todos los pasos desde el "a)" hasta el "c)" precisan el uso de distintas herramientas computacionales. Actualmente, existen diversos programas gratuitos con

los que poder realizar todo el proceso de reconstrucción ancestral de proteínas de manera eficaz (32).

Esta técnica científica ya se ha utilizado para el estudio y la mejora de proteínas actuales. Se pueden encontrar diversos ejemplos como puede ser la utilización de la reconstrucción ancestral de la proteína ancestral de factor VIII de coagulación, para producir una proteína con más estabilidad, menos inmunogénica y con una mejora de la actividad funcional (33); o la obtención, mediante ASR de mutantes de la enzima RUBISCO mucho más eficientes a la hora de fijar el CO_2 (34).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la acción y el origen de actividad hidrolítica de las β -lactamasas de clase A (atendiendo a la nomenclatura de Ambler) en este trabajo hemos caracterizado el perfil de resistencia de 4 β -lactamasas de espectro extendido y de un ancestro común reconstruido por ASR frente a 8 antibióticos β -lactámicos de uso clínico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

A partir de bacterias *E. coli* JM109 (*end* A1 *gln* V44 *thi*-1 *rel* A1 *gyr* A96 *rec* A1 *mcr* B⁺ Δ (*lac*-*pro* AB)e14- [F'*tra* D36 *pro* AB⁺ *lacI*^a *lacZ* Δ M15] *hsd* R17(rK⁻mK⁺), cedidas por la Dra. María Isabel Martínez Jiménez (CBMSO); y *E. coli* DH5E (F- ϕ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZ*Y A-*arg* F) U169 *end* A1 *rec* A1 *hsd* R17(r⁻ m⁺) *deo* R *thi*-1 *pho* A *sup* E44 λ ⁻ *gyr* A96 *rel* A1 *gal*⁻; ThermoFisher Scientific) se obtuvieron células electrocompetentes utilizando un protocolo estandarizado (35). El vector pACSE3 fue cedido por el Dr. Barry Hall (36). Los compuestos Aztreonam (ATM), Cefotaxima (CTX), Cefepima (FEP), Cefuroxima (CXM), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO) e Imipenem (IMP) se obtuvieron de la empresa MedChemExpress.

El medio de cultivo en polvo LB, ampicilina (AMP), tetraciclina (TET), glicerol y el isopropil- β -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) se consiguieron a través de la empresa AppliChem. La solución stock de cada uno de los antibióticos se realizó utilizando 0.1M de tampón NaPO_4 a pH 7.0 y se almacenó a -80°C en estas concentraciones: AMP, CTX y CXM a 128 g/L; TET a 15 g/L; FEP e IMP a 8 g/L; ATM, CAZ y CRO a 4 g/L. Las enzimas de restricción *Sac* I y *Bsp* HI, la DNA polimerasa Phusion® High-Fidelity (HF), la ligasa T4 y la enzima fosfatasa alcalina (CIP proveniente del inglés "*Calf intestine phosphate*") se adquirieron de la empresa New England Biolabs. El SYBR® Green II fluorescent dye, el medio de cultivo en polvo Müller-Hinton y los oligonucleótidos utilizados se compraron a la casa comercial μ -Aldrich. Los kits de purificación de ADN (*NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit*) y de aislamiento de plásmido se consiguieron a través de la empresa Macherey-Nagel.

2.2 Obtención y selección de secuencias de β -lactamasas ancestrales

2.2.1 Selección de secuencias de β -lactamasas actuales

Para este trabajo, se decidió estudiar la actividad hidrolítica de 4 enzimas actuales [caracterizadas por ser β -lactamasas de espectro extendido (*ESBLs* del inglés *extended spectrum β -lactamases*) y carbapenemasas]. En concreto se escogieron cuatro β -lactamasas, que de acuerdo con la clasificación de Ambler son: Una β -lactamasa de clase A capaz de hidrolizar el antibiótico β -lactámico carbapenem, denominada "*SME-1*" proveniente de *Serratia marcescens* S6 (37); Una *ESBL* de clase A denominada "*KLUG-1*" ó "*imiA*" proveniente de *Kluyvera georgiana* (38); Una carbapenemasa de clase A denominada "*BKC-1*" que procede de *Klebsiella pneumoniae* (39); Y otra *ESBL* de clase A capaz de hidrolizar carbapenem denominada "*KPC-1*" proveniente de una cepa resistente, *Klebsiella pneumoniae* 1534 (40).

2.2.2 Obtención de secuencias ancestrales

Para la selección de las secuencias ancestrales que han sido sintetizadas en el proyecto se contó con la colaboración del Dr. Barry G. Hall (*Bellingham Research Institute*), experto a nivel mundial en el estudio de la evolución experimental de β -lactamasas. Estas secuencias se obtuvieron a partir de 2 alineamientos: Uno construido a partir de las secuencias peptídicas de 48 β -lactamasas actuales utilizadas previamente en el trabajo realizado por Risso et al. en 2014 en combinación con las secuencias de las 4 enzimas nombradas en el apartado anterior, y otro alineamiento construido a partir de 16 secuencias de β -lactamasas de clase A e incluyendo las 4 proteínas actuales escogidas para el estudio, que pueden tener capacidad de hidrolizar carbapenémicos. Cabe destacar, que este segundo alineamiento se realizó para obtener un modelo más concreto de la filogenia de las β -lactamasas de clase A y su evolución hacia la resistencia hacia antibióticos carbapenémicos. La herramienta informática utilizada para alinear las secuencias fue el programa gratuito *Guidance 2*.

A partir de este alineamiento, se estimó la filogenia de estas secuencias mediante el método de máxima verosimilitud *ML* utilizando el programa informático gratuito *MEGA*. Finalmente, la obtención de las secuencias de ADN y proteínas más probables correspondientes a cada uno de los nodos del árbol filogenético se obtuvieron mediante la herramienta informática diseñada por el Dr. Barry G. Hall denominada *ExtAnceSeqProt*.

Tras obtener las secuencias ancestrales, el Dr. Barry G. Hall seleccionó aquellas situadas en los nodos que correspondían a los ancestros más comunes recientes (*MRCA* de sus siglas en inglés). En el caso de la filogenia construida con las 48 secuencias provenientes del trabajo de Risso et al., se seleccionaron los *MRCAs* de las Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Proteobacteria (gram negativas): nodos

75, 92 y 90, respectivamente. En el caso de la filogenia obtenida utilizando el conjunto de 16 β -lactamasas de clase A, se seleccionó el nodo perteneciente al *MRCA* más antiguo: nodo 26. (**Anexo ML-phylo**). Finalmente, se seleccionó un *MRCA* de β -lactamasas pertenecientes a bacterias gram negativas denominado GNCA (del inglés *Gram negative Common Ancestor*) que había sido caracterizado anteriormente (21) para ser utilizado como control.

2.2.3 Síntesis de secuencias ancestrales y actuales

Las secuencias pertenecientes a los nodos 75, 90, 92 y 26 (denominadas Anc 75, Anc 90, Anc 92 y Anc 26, respectivamente), así como la secuencia ancestral GNCA y la secuencia del gen actual *BKC-1* se obtuvieron mediante síntesis química (Eurofins Genomics) los genes actuales *KLUG-1* (*imiA*), *KPC-1* y *SME-1* se obtuvieron mediante amplificación por PCR a partir de muestras obtenidas del ADN bacteriano correspondiente. Este material genético se extrajo mediante el método fenol/cloroformo (35) a partir de las bacterias *Kluyvera georgiana* y *Serratia marcescens* S6, cedidas por el Dr. Patrice Nordmann, y *Klebsiella pneumoniae*, cedida por la Dra. Ana Cristina Galesa.

2.3 Clonaje de las secuencias ancestrales y actuales en el vector pACSE3

Todos los genes codificantes de β -lactamasas utilizados en este trabajo se clonaron dentro del vector pACSE3 (Figura 2).

Tanto los genes obtenidos por síntesis química, como el ADN purificado de las bacterias *Kluyvera georgiana*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* S6 se amplificaron por PCR utilizando parejas de iniciadores específicos (Tabla A1). Durante esta amplificación, se introdujeron por mutagénesis dirigida las dianas de las enzimas de restricción *SacI* y *Bsp HI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, de los genes de interés. Los amplicones obtenidos se purificaron con el kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up y se digirieron utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *Bsp HI* durante 1 h a 37 °C para obtener el ADN utilizado como inserto. Todo el producto de digestión se cargó en un gel de agarosa (1% p/v), y tras electroforesis se aisló del gel mediante el kit. Por otro lado, el vector pACSE3 purificado mediante el kit NucleoSpin™ Plasmid Miniprep, se digirió utilizando las mismas enzimas de restricción en presencia de CIP para eliminar los fosfatos de los extremos 5' de las cadenas de ADN.

Una vez realizada la digestión tanto el vector como los como insertos se purificaron y se ligaron (utilizando una relación molar entre el vector y el inserto de 1:7) con ligasa T4 durante 1 h a 25 °C. Tras la ligación, se procedió a la purificación utilizando el kit correspondiente.

Finalmente, 2 μ L del producto purificado de la ligación se transformaron en 50 μ L de bacterias *E. Coli* DH5E electrocompetentes utilizando un electroporador *Gene Pulser® II Electroporation System* siguiendo las indicaciones del fabricante. Este proceso se realizó con

cada una de las construcciones de interés, obteniendo así 9 transformantes diferentes que contenían en su interior el plásmido con el gen de interés. Estas bacterias se multiplicaron y una alícuota de cada una de ellas se conservaron a -80°C en presencia glicerol al 20% para su posterior uso. Asimismo, se comprobó mediante secuenciación la correcta estructura de cada una de las construcciones.

2.4 Puesta a punto del método para medir la funcionalidad de las β -lactamasas seleccionadas

Para medir la actividad de las β -lactamasas estudiadas en este trabajo, se decidió utilizar el método de la mínima concentración inhibitoria (MICs del inglés *Minimal inhibitory concentrations*), utilizado históricamente para la detección de resistencia de una bacteria ante un antibiótico (41). Se utilizó una placa de 96 pocillos (M-96, 8 filas por 12 columnas) como soporte para medir la resistencia de cada uno de las β -lactamasas los 8 antibióticos utilizados en este estudio: ampicilina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, cefuroxima e imipenem. Se añadieron, en cada una de las 8 filas de la placa, diferentes concentraciones de cada compuesto. Desde la columna 12 a la columna 2, la concentración de antibiótico en cada uno de los pocillos fue la mitad de la del pocillo anterior. De este modo, el segundo pocillo de cada fila contendrá la mínima concentración de antibiótico y el último la máxima concentración de antibiótico. El primer pocillo de cada fila se mantuvo libre de antibiótico y se utilizó como control negativo del

efecto inhibitorio de estos compuestos. Las concentraciones de antibiótico utilizadas en cada placa se indican en la sección correspondiente de Resultados. Después de incubar la placa durante 20 horas a 30°C , se midieron la densidad óptica (O.D.) de cada uno de los pocillos utilizando un espectrofotómetro lector de placas FLUOstar® Omega (BMG labtech) a una longitud de onda de 600 nm.

3. RESULTADOS

3.1. Puesta a punto del método para el análisis de las secuencias ancestrales

El objetivo de este trabajo es medir y comparar la actividad enzimática de varias β -lactamasas frente a un grupo de antibióticos. Asimismo, se decidió medir la concentración mínima de antibiótico que era capaz de inhibir el crecimiento de cultivos de *E. coli* que expresaban los genes recombinantes de β -lactamasas. De modo que en una única placa M-96 se analiza el efecto β -lactámico de una única enzima frente a 8 antibióticos diferentes. Para ello, se crece un cultivo de bacterias transformadas con plásmidos que portaban el gen de interés en 10 mL medio Müller-Hinton (M-H) durante toda la noche a 37°C en presencia de 0.1 mM IPTG y 10 $\mu\text{g/mL}$ de TET. Esta incubación se realiza en tubos de 15 mL y cerrados para limitar la aireación del cultivo. Al día siguiente, se diluye el cultivo para que contenga una concentración de 5×10^5 unidades formadoras de colonia (CFU) por mL. Se añaden 200 μL de esta disolución en cada uno de los pocillos de una placa M-96 y 500 μL en 8 tubos eppendorf. En cada tubo eppendorf se diluye cada uno de

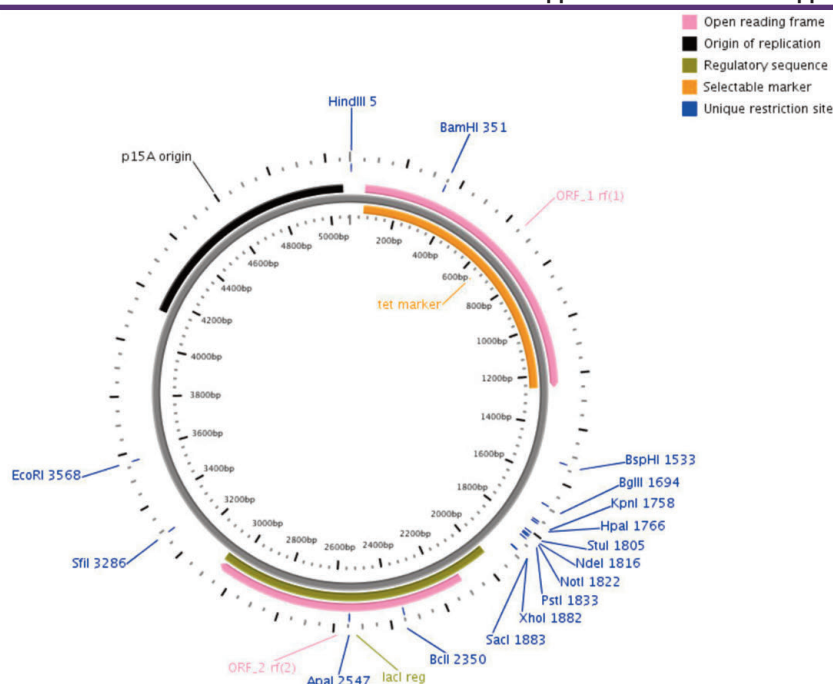


Figura 2: Plásmido pACSE3 utilizado para el clonaje de los genes utilizados en este estudio. Se muestra muestra el sitio de policlonaje con las dianas de restricción utilizadas (*Bsp HI* y *Sac I*), el gen de resistencia Tet (en naranja) y la región lac (en verde).

Tabla 1: Resumen de las concentraciones utilizadas en el trabajo junto con los criterios de sensibilidad y resistencia establecidos.

Fila ¹	Antibiótico (tipo de β -lactámico)	Abreviación	Máxima concentración ²	Mínima concentración ³	Límite de sensibilidad ⁴
A	Ampicilina (penicilina)	AMP	8192	$195,3 \times 10^{-5}$	$\leq 8 > 8$
B	Aztreonam (monobactámico)	ATM	1024	780×10^{-5}	$\leq 1 > 4$
C	Ceftazidima (cefalosporina)	CAZ	2048	$6,1 \times 10^{-5}$	$\leq 1 > 4$
D	Ceftriaxona (cefalosporina)	CRO	512	$12,2 \times 10^{-5}$	$\leq 1 > 2$
E	Cefotaxima (cefalosporina)	CTX	512	$12,2 \times 10^{-5}$	$\leq 1 > 2$
F	Cefuroxima (cefalosporina)	CXM	8192	$6,1 \times 10^{-5}$	$\leq 8 > 8$
G	Cefepima (cefalosporina)	FEP	64	$24,4 \times 10^{-5}$	$\leq 1 > 4$
H	Imipenem (carbapenem)	IMP	512	$12,2 \times 10^{-5}$	$\leq 2 > 8$

¹ Se indica la fila que corresponde a cada fila de la placa M-96.

^{2 y 3} Indica la concentración máxima (2) y mínima (3) en $\mu\text{g/mL}$ de inhibidor utilizada en cada caso

⁴ Se indican (en $\mu\text{g/mL}$) las concentraciones de antibiótico por debajo de la cual (izquierda) o por encima de la cual (derecha) se considera que una población de *E. coli* es sensible o resistente, respectivamente, a un antibiótico.

los antibióticos utilizados en el estudio. La concentración de cada antibiótico en el tubo es igual al doble de la concentración máxima utilizada en el ensayo (Tablas A2-A8). En el pocillo duodécimo de cada fila de la placa M-96 se añaden 200 μL del tubo eppendorf que contiene el antibiótico correspondiente (Tabla 1). A partir del último pocillo de cada fila de la M96 se realizaron diluciones seriadas añadiendo a cada pocillo 200 μL del pocillo anterior hasta el segundo pocillo de cada fila. De este modo, el primer pocillo de cada fila se utiliza como control positivo de crecimiento bacteriano en ausencia de antibiótico. Se incubó la placa M-96 a 30 °C con aireación durante 20-22h. y transcurrido este periodo, se mide la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 600 nm para determinar el crecimiento bacteriano.

De acuerdo con el Dr. Barry Hall y la literatura consultada (36, 37) se establecieron, para cada proteína recombinante, las concentraciones máxima y mínima de cada uno de los antibióticos utilizados para medir la actividad hidrolítica (Tabla 1). Además, se establecieron las concentraciones de fármaco a partir de las cuales se considera que *E. coli* es sensible o resistente al efecto antibiótico (Tabla 1).

Para hallar las concentraciones máxima y mínima utilizadas, inicialmente se realizó un experimento en el que se usaron las mismas concentraciones de antibiótico en cada una de las placas correspondiente a cada β -lactamasa. A partir de estos datos, se pudieron ajustar las concentraciones adecuadas de cada antibiótico para calcular de manera fiable, a cada β -lactamasas, los valores de inhibición de crecimiento. Las concentraciones finales de cada fármaco utilizadas en cada caso se indican en el Anexo (Tablas A2-A8).

3.2. Comprobación del sistema biológico escogido para analizar las β -lactamasas ancestrales

Para comprobar la resistencia de un gen ancestral ya caracterizado, se ha decidido medir los valores de MICs del gen reconstruido GNCA frente a los 8 antibióticos utilizados en este ensayo. Estos valores nos dan información de la actividad de este gen expresado a partir del vector que se utiliza en nuestro estudio (el pACSE3), confirmando que el vector es viable y permite la funcionalidad de β -lactamasas ancestrales. Asimismo, se calculan las MICs de bacterias *E. Coli* DH5E que carecen del plásmido pACES3, como control para verificar que las bacterias utilizadas no presentan



Tabla 2: Concentraciones inhibitorias y letales de los distintos anti-bióticos a *E. coli*, GNCA, Anc 26, Anc 75, Anc 90 y Anc 92

Antibiótico	E. coli, Anc 75, Anc 90 y Anc 92		GNCA		Anc 26	
	MLC ¹	MIC ¹	MLC	MIC	MLC	MIC
AMP	1	0,5	32	16	32	8
ATM	0,0313	0,0156	0,5	0,25	256	128
CAZ	0,125	0,0625	0,5	0,125	32	16
CRO	0,125	0,0313	64	8	16	4
CTX	0,0625	0,0313	64	8	4	2
CXM	0,5	0,25	512	256	4	2
FEP	0,0313	0,0313	2	0,25	2	1
IMP	0,0625	0,0313	0,125	0,0625	0,0625	0,0313

¹ los valores MIC y MLC se muestran en µg/mL

utilizados y en el caso de que la presenten, establecer esos valores como base.

Los resultados obtenidos demuestran en nuestro sistema, que el gen GNCA se expresa como una proteína que presenta resis-

tencia a los antibióticos AMP, CAZ, CRO y CTX, tal como se observó anteriormente (Risso, Gavira et al. 2013). Además, las bacterias *E. coli* no transformadas son susceptibles a todos los compuestos utilizados en este trabajo, por lo tanto, la resistencia a los antibióticos se debe específicamente a las β-lactamasas recombinantes expresadas por el plásmido pACSE3 (Tabla 2). Estos datos demuestran que nuestro sistema es efectivo para poder determinar la actividad hidrolítica de distintas β-lactamasas.

3.3. Obtención de MIC y MLC de cada gen

A partir de los datos obtenidos se obtiene los valores de MICs de cada una de las β-lactamasas estudiadas frente a cada uno de los antibióticos utilizados. Se determinó también de manera separada el valor de la mínima concentración letal de antibiótico (MLC del inglés "*minimal lethal concentration*") ya que es un error frecuente considerar los valores de MIC y MLC equivalentes, cuando en realidad el valor de MIC corresponde a la concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano y que no tiene por qué coincidir con el valor MLC. Los valores MIC y MLC de cada uno de las β-lactamasas utilizadas, así como el control de *E. coli* no transformada y controles aparecen en las tablas 2 y 3.

Los resultados muestran que las cuatro β-lactamasas utilizadas en este estudio presentan distintos grados de resistencia a los antibióticos analizados, mientras que, de las β-lactamasas ancestrales observados en este estudio, sólo el producto de expresión de Anc26 muestra resistencia a todos los antibióticos utilizados excepto frente a IMP, mientras que el resto no resultaron activas.

Tabla 3: Concentraciones inhibitorias y letales de los distintos antibióticos frente a las β-lactamasas actuales

Antibiótico	BKC-1		KLUG-1		KPC-1		SME-1	
	MLC ¹	MIC ¹	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC
AMP	512	64	8192	2048	128	16	32	8
ATM	2	0.0313	4	0.5	2	0,25	256	128
CAZ	1	0.25	0.25	0.125	0.25	0,125	32	16
CRO	16	0.5	128	32	1	8	16	4
CTX	4	0.125	64	16	0.125	8	4	2
CXM	128	4	2048	512	16	256	4	2
FEP	0.5	0.0625	32	2	0.0625	0,25	2	1
IMP	0.5	0.25	0.125	0.0313	1	0,0625	0,0625	0,0313

Los valores MIC y MLC se muestran en µg/mL

3.4. Obtención del mejor generalista y el mejor especialista

Para tener una mejor comprensión de los resultados, se decidió analizar que enzima presenta resistencia a mayor número de antibióticos (más generalista) y cual es el más resistente a cada uno de los β -lactámicos (más especialista). Para este análisis se calcula el logaritmo en base 2 de los valores *MLC* obtenidos en cada caso (Tabla 4). De este modo se obtiene un valor arbitrario adimensional que sirve para comparar fácilmente la actividad de los distintos genes estudiados en este trabajo (Tabla 5).

En relación a las β -lactamasas actuales, los resultados demuestran que KLUG-1 es la β -lactamasa más generalista de las examinadas en este trabajo, además, presenta los valores de resistencia más altos frente a 5 de los 8 antibióticos estudiados (AMP, CRO, CTX, CXM y FEP), mientras que SME-1 es la que presenta los valores más altos de resistencia frente a ATM e IMP, siendo la única enzima de las seleccionadas que presenta resistencia a este carbapenem. Finalmente, el producto del gen Anc 26 presenta el mayor nivel de resistencia frente a ceftazidima de todas las β -lactamasas estudiadas y se comporta como un generalista intermedio.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se han obtenido diferentes secuencias proteicas de β -lactamasas ancestrales para analizar su actividad y posteriormente compararlas con secuencias actuales. Como se establecía en la introducción, estas enzimas son de vital interés, debido a los estragos sanitarios que producen y pueden producir en el futuro. Es por ello, que en este trabajo se caracterizó las diferentes actividades

hidrolíticas que presentan las β -lactamasas estudiadas y sirve para validar la metodología de reconstrucción de proteínas ancestrales.

La clasificación de las enzimas estudiadas según el índice de actividad establecido en este trabajo es KLUG-1 > SME-1 > Anc 26 > BKC-1 > KPC-1. Sin embargo, aunque KLUG-1 es la β -lactamasa que presenta los valores más altos de resistencia frente al mayor número de antibióticos, es el producto génico ancestral Anc 26 el más generalista al mostrar resistencia a mayor número de antibióticos (Tabla 5), siendo sensible únicamente a imipenem, un antibiótico altamente resistente a la acción de las β -lactamasas (42). Aunque es cierto que los antibióticos utilizados en este estudio son sintéticos o semi-sintéticos, se considera que los genes ancestrales codifican proteínas más generalistas que pueden evolucionar mediante selección convirtiéndose en genes especialistas (43, 44).

Esta idea se sustenta aún más cuando existen ciertos estudios que demuestran que las β -lactamasas evolucionaron directamente de las PBPs (enzimas contra las que actúan los β -lactámicos (45).

Se observa en los resultados que el producto génico de Anc 26, es el más resistente frente a ceftazidima (CAZ). Esta cefalosporina se caracteriza por ser un antibiótico estratégico, debido a que no se utiliza a gran escala en el ámbito hospitalario. Es posible que este hecho haya impedido que las β -lactamasas actuales analizadas en este estudio no hayan estado suficientemente expuestas a este antibiótico para adquirir una resistencia mayor que la de la secuencia ancestral. Por el contrario, la resistencia mostrada por Anc26 a este compuesto se debería a su promiscuidad inherente. En un estudio en el que se evolucionó *in vitro* la *ESBL* CTX-M9 (46),

Tabla 4: Resumen de los valores de *MLC* obtenidos¹

Antibióticos	Límite de sensibilidad	BKC-1	KLUG-1	KPC-1	SME-1	Anc 26
AMP	$\leq 8, > 8$	512	8192	128	4096	32
ATM	$\leq 1, > 4$	2	4	2	1024	256
CAZ	$\leq 1, > 4$	1	0,25	0,25	4	32
CRO	$\leq 1, > 2$	16	128	1	4	16
CTX	$\leq 1, > 2$	4	64	0,125	1	4
CXM	$\leq 8, > 8$	128	2048	16	64	4
FEP	$\leq 1, > 4$	0.5	32	0,0625	0,125	2
IMP	$\leq 2, > 8$	0.5	0,25	1	128	0,0625

¹ Los valores *MLC* se muestran en $\mu\text{g/mL}$. Se indica en color rojo los valores que están por encima del límite de sensibilidad (resistentes), en negro los valores que están en el límite de sensibilidad y en azul los valores que están por debajo del límite de sensibilidad (sensibles).



Tabla 5: valores de los Logaritmos obtenidos a partir de los datos de MLC mostrados en la Tabla ¹

Antibióticos	BKC-1	KLUG-1	KPC-1	SME-1	Anc 26
AMP	9	13	7	12	5
ATM	1	2	1	10	8
CAZ	0	-2	-2	2	5
CRO	4	7	0	2	4
CTX	2	6	-3	0	2
CXM	7	11	4	6	2
FEP	-1	5	-4	-3	1
IMP	-1	-2	0	7	-4
Índice de actividad ²	2,6	5	0,4	4,5	2,9
Índice generalista ³	5	6	3	6	7

¹Se indica en color rojo los valores que corresponden con MLCs que están por encima del límite de sensibilidad (resistentes), en negro los valores que se corresponden con los MLCs que están en el límite de sensibilidad y en azul los valores que se corresponden con los MLCs que están por debajo del límite de sensibilidad (sensibles). Se remarca en amarillo el valor más alto de resistencia para cada antibiótico.

²El índice de actividad es el promedio de los valores de logaritmo obtenidos.

³El índice generalista señala el número de antibióticos frente a los cuales la β -lactamasa correspondiente muestra resistencia

una β -lactamasa filogenéticamente muy cercana a KLUG-1, se obtuvieron diferentes mutantes seleccionando contra CAZ tras varias rondas de selección. En dicho estudio, la variante que más resistencia mostró frente a CAZ (MIC = 128 μ g/mL, con respecto a MIC 1 μ g/mL mostrado por la proteína parental), presenta 5 sustituciones con respecto a CTX-M9: P167S, A109T, G146R, T227A, Q254P (variante A6B1C1). La proteína derivada de Anc 26 presenta 3 de estos cambios (T180, A198 y P221 correspondientes a los cambios A109T, T227A, Q254P que aparecen en A6B1C1), además de contener una sustitución conservativa (K117 en la posición correspondiente G146R que aparece en A6B1C1). El resto de las proteínas actuales (BKC-1, KLUG-1, KPC-1 y SME-1) solamente presentan una o dos de estas mutaciones. La presencia de estos cambios en la estructura de Anc 26 podría ser responsable de la mayor resistencia frente CAZ. Este hecho refuerza el poder predictivo que pueden tener las proteínas ancestrales a la hora de mostrar residuos que pudieran ser determinantes de resistencia a un antibiótico.

En este estudio hemos obtenido distintas secuencias ancestrales que representarían diferentes nodos del árbol filogenético perteneciente a la historia evolutiva de las β -lactamasas. Sin embargo, solamente una de ellas (Anc 26) ha resultado ser funcional. Una característica que presenta la β -lactamasa Anc 26 es un extremo N-terminal unos 10 aminoácidos más largo que el resto de las proteínas ancestrales inferidas en este estudio.

Las β -lactamasas se caracterizan por tener una región muy variable en este extremoterminal (47), que es imprescindible para que la enzima sea exportada al espacio periplásmico donde realizan su función (48), lo que dificulta el alineamiento de secuencia, la obtención de una filogenia fiable y por lo tanto la inferencia de la secuencia ancestral correspondiente.

Estos problemas se traducen en la obtención de proteínas truncadas o directamente mal plegadas y podrían ser la causa de la falta de actividad de las proteínas obtenidas a partir de Anc 75, Anc 90 y Anc 92. En este trabajo se ha obtenido una secuencia ancestral funcional para poder comparar su actividad con la de sus homólogos actuales bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos están en concordancia con los resultados previamente publicados que demuestran la relevancia de la reconstrucción de proteínas ancestrales para caracterizar y entender el comportamiento de sus homólogos actuales (21, 49).

Un objetivo adicional de este trabajo es establecer un punto de partida para la realización de experimentos de evolución dirigida de proteínas en paralelo tanto de las β -lactamasas ancestrales como de las actuales. Este tipo de estudios podrían proporcionar una gran información sobre la evolución natural de las β -lactamasas que nos podría permitir anticipar y predecir el tipo de mutaciones de resistencia antes de su aparición.

5. CONCLUSIÓN

Los datos presentados demuestran que la proteína obtenida a partir de la secuencia ancestral reconstruida Anc 26 es activa y muestra resistencia a varios antibióticos. Esta secuencia muestra niveles de resistencia frente a CAZ mayores que cualquiera de las β -lactamasas actuales estudiadas. Los datos obtenidos confirman que las proteínas ancestrales son más generalistas que las proteínas actuales, esta estrategia podría servir como un punto de partida prometedor para la obtención de proteínas de interés biotecnológico, ya que la promiscuidad es una de las principales características a la hora de producir nuevas proteínas mediante evolución in vitro de proteínas (50).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham Minsky, Richard G. Summers, Jeremy R. Knowles, 1986. Secretion of β -lactamase into the Periplasm of *Escherichia coli*: Evidence for a Distinct Release Step Associated with a Conformational Change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), pp. 4180-4184.
2. Alcalde, M., 2017. When directed evolution met ancestral enzyme resurrection. *Microbial Biotechnology*, 10(1), pp. 22-24.
3. Alexander Fleming, 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.
4. Aminov, R.I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in microbiology*, 1, pp. 134.
5. Arenas, M., Weber, C.C., Liberles, D.A., Bastolla, U., 2017. ProtASR: An Evolutionary Framework for Ancestral Protein Reconstruction with Selection on Folding Stability. *Systematic biology*, 66(6), pp. 1054-1064.
6. Barlow, M., Hall, B.G., 2003a. Experimental Prediction of the Natural Evolution of Antibiotic Resistance. *Genetics*, 163(4), pp. 1237-1241.
7. Barlow, M., Hall, B.G., 2003b. Experimental Prediction of the Natural Evolution of Antibiotic Resistance. *Genetics*, 163(4), pp. 1237-1241.
8. Barlow, M., Hall, B.G., 2002. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics*, 160(3), pp. 823-832.
9. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases, its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), pp. 1211-1233.
10. Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), pp. a025247.
11. Christiane Bébéar, Janet A. Robertson, 1996. Determination Of Minimal Inhibitory Concentration. In: ACADEMIC PRESS INC, ed, *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*.
12. Crofts, T.S., Gasparrini, A.J., Dantas, G., 2017. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature reviews. Microbiology*, 15(7), pp. 422-434.
13. David L. Paterson, Robert A. Bonomo, 2005. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update.
14. Delmas, J., Robin, F., Carvalho, F., Mongaret, C., Bonnet, R., 2006. Prediction of the Evolution of Ceftazidime Resistance in Extended-Spectrum-Lactamase CTX-M-9. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), pp. 731-738.
15. Donald J Tipper, Jack L. Strominger, 1965. Mechanism of action of Penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-d-alanyl-d-alanine*.
16. Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013. β -Lactams. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), pp. 7-17.
17. Finch, R.G., Whitley, R.J., Norrby, S.R., Greenwood, D., 2010. Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. *Saunders*.
18. Gomez-Fernandez, B.J., Garcia-Ruiz, E., Martin-Diaz, J., Gomez De Santos, P., Santos-Moriano, P., Plou, F.J., Ballesteros, A., Garcia, M., Rodriguez, M., Risso, V.A., Sanchez-Ruiz, J.M., Whitney, S.M., Alcalde, M., 2018. Directed -in vitro- evolution of Precambrian and extant Rubiscos. *Scientific reports*, 8(1), pp. 5532-11.
19. Gumulya, Y., Gillam, E.M.J., 2017. Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: the 'retro' approach to protein engineering. *The Biochemical journal*, 474(1), pp. 1-19.
20. Hall, B.G., 2004. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), pp. 430-435.
21. IACG. NO PODEMOS ESPERAR: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. Madrid: Prisacom; 2019 Mar 15.
22. Källberg, C., Årdal, C., Salvesen Blix, H., Klein, E., M Martinez, E., Lindbæk, M., Outtersen, K., Røttingen, J., Laxminarayan, R., 2018. Introduction and geographic availability of new antibiotics approved between 1999 and 2014. *PloS one*, 13(10), pp. e0205166.
23. Karen Bush, 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62. pp. 1076-18.



24. Karen Bush, Patrice Courvalin, Gautam Dantas, Julian Davies, Barry Eisenstein, Pentti Huovinen, George A. Jacoby, Roy Kishon, Barry N. Kreiswirth, Elizabeth Kutter, 2011. Tackling antibiotic resistance. *BMJ (Clinical research ed.)*, 340(may18 2),.
25. Kong, K., Schnepfer, L., Mathee, K., 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), pp. 1-36.
26. Livermore, D., 2004. Can better prescribing turn the tide of resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), pp. 73-78.
27. Luepke, K.H., Suda, K.J., Boucher, H., Russo, R.L., Bonney, M.W., Hunt, T.D., Mohr, J.F., 2017. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 37(1), pp. 71-84.
28. Melise Chaves Silveira, Rangelina Azevedo Da Silva, Fábio Faria Da Mota, Marcos Catanho, Rodrigo Jardim, Ana Carolina, R. Guimarães, Antonio B De Miranda, 2018. Systematic Identification and Classification of β -Lactamases Based on Sequence Similarity Criteria: β -Lactamase Annotation. , pp. 1-11.
29. Meroueh, S.O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B.K., Mobashery, S., 2003. Structural Aspects for Evolution of β -Lactamases from Penicillin-Binding Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 125(32), pp. 9612-9618.
30. Neelanjana Pandey, Marco Cascella, 2019. Beta Lactam Antibiotics. *StatPearls*, 20(10) pp. 20.
31. Nicoletti, A.G., Marcondes, M.F.M., Martins, Willames M B S, Almeida, L.G.P., Nicolás, M.F., Vasconcelos, A.T.R., Oliveira, V., Gales, A.C., 2015. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(9), pp. 5159-5164.
32. Novais, A., Comas, I., Baquero, F., Cantón, R., Coque, T.M., Moya, A., González-Candelas, F., Galán, J., 2010. Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLoS pathogens*, 6(1), pp. e1000735.
33. Arveen Salahuddin, Amit Kumar, Asad U. Khan, 2018. Structure, Function of Serine and Metallo- β -lactamases and their Inhibitors. *Current Protein & Peptide Science*, 19(2), pp. 130-144.
34. Pazos, M., Peters, K., 2019. Peptidoglycan. *Sub-cellular biochemistry*, 92, pp. 127-168.
35. Philippon, A., Slama, P., Dény, P., Labia, R., 2016. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical microbiology reviews*, 29(1), pp. 29-57.
36. Poirer, L., Kampfer, P., Nordmann, P., 2002. Chromosome-Encoded Ambler Class A -Lactamase of *Kluyvera georgiana*, a Probable Progenitor of a Subgroup of CTX-M Extended-Spectrum -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), pp. 4038-4040.
37. R. P. Ambler, 1980. The structure of β -lactamases. The Royal Society.
38. Risso, V.A., Gavira, J.A., Mejia-Carmona, D.F., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M., 2013. Hyperstability and Substrate Promiscuity in Laboratory Resurrections of Precambrian β -Lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), pp. 2899-2902.
39. Sambrook, J., Green, M.R., 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th edn. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Siddiq, M.A., Hochberg, G.K., Thornton, J.W., 2017. Evolution of protein specificity: insights from ancestral protein reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, pp. 113-122.
41. Thierry Naas, Laurence Vandel, Wladimir Sougakoff, David M. Livermore, Patrice Nordmann, 1994. Hydrolyzing Class A β -Lactamase, Sme-1, from.
42. Thornton, J.W., 2004. Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules. *Nature Reviews Genetics*, 5(5), pp. 366-375.
43. Ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N.A., Han, B., Gao, J., 2018. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed research international*, 2018, pp. 9519718-14.
44. Usman Umar Zango, Munir Ibrahim, Sadiq Abdurrahman, Abubakar Shawai, Ibrahim Muhammad Shamsuddin, 2019. A review on β -lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Des Develop Ther.*, pp. 52-58.
45. Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 149-167.
46. WHO, 2018. WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption
47. Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), pp. 1151-1161.
48. Zakas, P.M., Brown, H.C., Knight, K., Meeks, S.L., Spencer, H.T., Gaucher, E.A., Doering, C.B., 2017. Enhancing the pharmaceutical properties of protein drugs by ancestral sequence reconstruction. *Nature biotechnology*, 35(1), pp. 35-37.



49. Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T., 2008. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 361-385.
50. Zhang, G., Hao, Q., 2011. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *The FASEB Journal*, 25(8), pp. 2574-2582.
51. Zou, T., Risso, V.A., Gavira, J.A., Sanchez-Ruiz, J.M. and Ozkan, S.B., 2015. Evolution of Conformational Dynamics Determines the Conversion of a Promiscuous Generalist into a Specialist Enzyme. *Molecular biology and evolution*, 32(1), pp. 132-143.

Si desea citar nuestro artículo:

**Reconstrucción ancestral de una β -lactamasa y comparativa
con sus homólogos actuales**

Gonzalo Fernández Balaguer, Carmen Del Águila,
Carolina Hurtado Marcos y Rubén Agudo Torres

An Real Acad Farm [Internet].

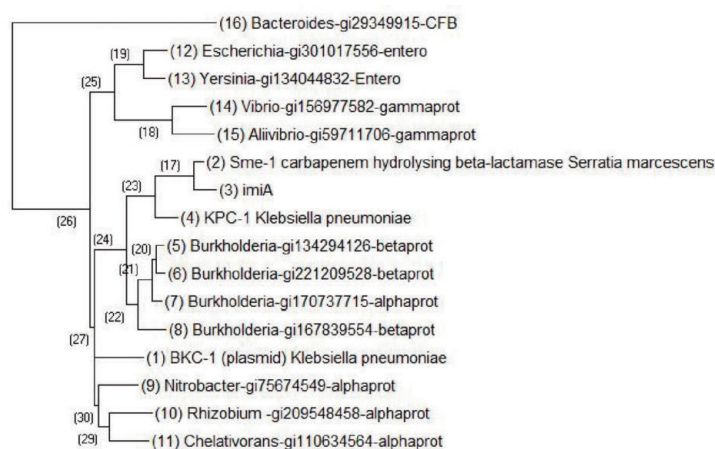
An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 155- 170

DOI: <http://>

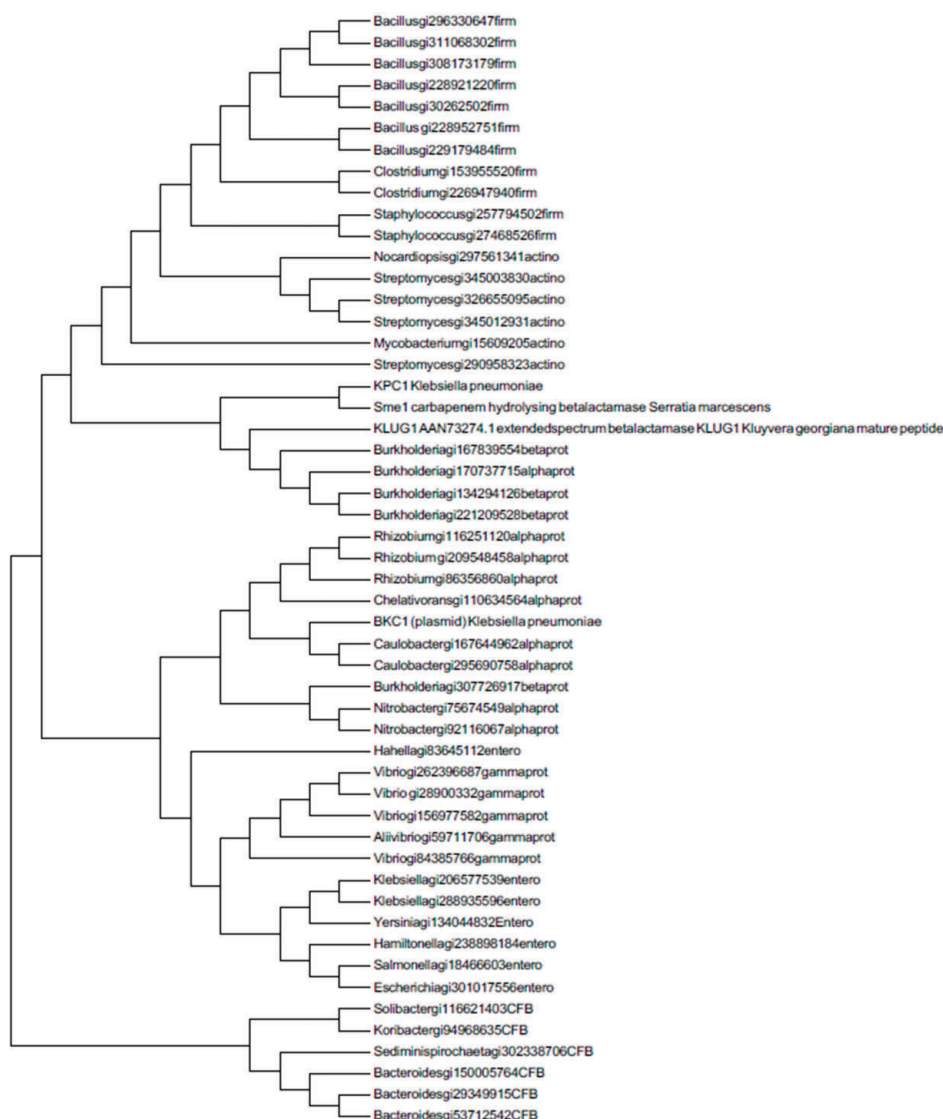


ANEXO

Anexo ML-phylo



Anexo ML-phylo



Ancestral reconstruction of a β -lactamase and comparison with its extant proteins

Tabla A1: Primers utilizados en el clonaje

Nombre del primer	Secuencia de primers	Genes amplificados
Sme-1_Fw	Caatttcacacaggaaacagatcatgagtaacaaagtaaatttttaa ¹	SME-1
Sme-1_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttaataatgcctgaattgc	
ancestral75_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagccagcatttcgtgtggc	ANC 75
ancestral75_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttattaaaacgctgcggc	
ancestral90_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagccagcatttcgcgtagc	ANC 90
ancestral90_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttattaaaacgcagccgcgac	
ancestral92_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagccagcatttcgcgtagc	ANC 92
ancestral92_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttattaaaacgcggctaccacc	
KPC-1_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagtaccgctgtgtggcc	KPC-1
KPC-1_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttattattggccattgactccag	
BKC-1_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagcatttcgcgcgcg	BKC-1
BKC-1_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttattatcaggcctcgcgggc	
KLUG-1_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagcagcgttaagc	KLUG-1
KLUG-1_rv	gtcaacgtaaaactagtagtcttcgagctcttactaattaccgtagtgacgatttc	
ancestral26_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagcagcatttcgcgtagc	ANC 26
ancestral26_rv	acgtaaaactagtagtcttcgagctcttattacatctccatgacgatgcg	
GNCA_Fw	caatttcacacaggaaacagatcatgagtagcagcatttcgtgtggc	GNCA
GNCA_rv	cgtaaaactagtagtcttcgagctcttattagaacgcttcgaccaccaag	

Tablas A2-A8: Concentraciones utilizadas de cada antibiótico en cada uno de los pocillos de la placa M-96

Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen SME-1												
AMP	0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
ATM	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
CAZ	0	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
CRO	0	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
CTX	0	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
CXM	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
FEP	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
IMP	0	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512

Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen KLUG-1												
AMP	0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
ATM	0	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
CAZ	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
CRO	0	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
CTX	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
CXM	0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
FEP	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
IMP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8



Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen KPC-1												
AMP	0	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
ATM	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,1250	0,2500	0,5	1	2	4	8
CAZ	0	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
CRO	0	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4
CTX	0	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
CXM	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
FEP	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
IMP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8

Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen BKC-1												
AMP	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
ATM	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
CAZ	0	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4
CRO	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
CTX	0	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
CXM	0	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
FEP	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
IMP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8

Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen ANC 26												
AMP	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
ATM	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
CAZ	0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
CRO	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
CTX	0	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
CXM	0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
FEP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
IMP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8

Concentraciones ¹ de antibiótico para los genes Anc 70, anc 90, 92 y para <i>E. coli</i>												
AMP	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
ATM	0	0,0001	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125
CAZ	0	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25
CRO	0	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25
CTX	0	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25
CXM	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
FEP	0	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
IMP	0	0,0001	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125

Concentraciones ¹ de antibiótico para el gen GNCA												
AMP	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
ATM	0	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
CAZ	0	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
CRO	0	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
CTX	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
CXM	0	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
FEP	0	0,0156	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
IMP	0	0,0010	0,0020	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1

¹Concentraciones están medidas en µg/mL

FARMACIA Y PLANTAS MEDICINALES EN LA LITERATURA: CASO DE GARCÍA MÁRQUEZ

PHARMACY AND MEDICINAL PLANTS IN THE LITERATURE: CASE OF GARCÍA MÁRQUEZ

Francisco José González Minero¹, Luis Bravo Díaz²

¹ Dpto. Biología Vegetal y Ecología -Botánica-. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

² Academia Iberoamericana de Farmacia. Exmiembro Dpto. Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

corresponding author: minero@us.es, luisbravo@us.es

REVISIÓN

RESUMEN

Se trata de un trabajo bibliográfico que pretende obtener una "Mirada Farmacéutica" de la obra de García Márquez. En el mismo se relacionan plantas medicinales o derivados, algunos medicamentos y aspectos farmacéuticos, con las referencias literarias que aparecen en una muestra representativa de las novelas del autor, entre las que se incluyen Cien años de soledad y amor en los Tiempos del cólera.

Estas novelas transcurren en lugares imaginarios o reales de Colombia en los siglos XIX y primera mitad del XX. De forma mayoritaria se han encontrado remedios vegetales y en menor medida de origen químico y animal. Para cada uno de ellos se han realizado observaciones e interpretaciones medicamentosas, sociales e históricas, que ponen en valor la farmacia y las plantas medicinales, que el autor ha usado como recursos para construir las novelas, con independencia de que tengan una base científica o no. Para ello se acompañan con las literarias textuales. Como conclusión, destacamos la forma magistral con la que García usa estos recursos y recomendamos sus lecturas o relecturas, teniendo en cuenta también al mismo tiempo se puede hacer desde un punto de vista farmacéutico.

ABSTRACT

It is a bibliographic work that aims to obtain a "Pharmaceutical Look" at the work of García Márquez. It relates medicinal or associated plants, some medicinal and pharmaceutical aspects, with literary works that appear in a representative sample of the author's novels, including One Hundred Years of Solitude and Love in the Times of Cholera.

These novels take place in imaginary or real places in Colombia in the 19th century and the first half of the 20th. Plant remedies and to a lesser extent chemical and animal remedies have been found. For each of them, observations and interpretations medical, social and historical, have been made that value the pharmacy and medicinal plants, which the author has used as resources to build the novels, regardless of whether they have a scientific basis or not. For this they are accompanied by textual literary texts. In conclusion, we highlight the masterful way in which García uses these resources and we recommend their reading or re-reading, also taking into account that at the same time it can be done from a pharmaceutical point of view.

Palabras Clave:

Etnobotánica
Etnofarmacología
Farmacognosia
García Márquez
Historia de la Farmacia

Keywords:

Ethnobotany
Ethnopharmacology
García Márquez
History of Pharmacy
Pharmacognosy



1. INTRODUCCIÓN

A medida que se van leyendo las novelas *Cien años de soledad* o *Amor en los tiempos del cólera*, van apareciendo numerosas referencias botánicas en forma de nombre comunes de plantas, a menudo muy acompañadas de la prosa poética del autor. En estas dos novelas se recogen más de 170 referencias botánicas: plantas con interés alimenticio, usadas en jardinería, aromáticas, que forman parte del paisaje, medicinales, etc. (1). A lo largo de su biografía, hemos encontrado algunas relaciones explícitas entre García Márquez y el mundo de la Botánica. En su niñez, en el colegio de jesuitas de Barranquilla, el narrador hizo "sin pestañear" unos dibujos de botánica que le había encargado el hermano Reyes (2). De joven, en su retiro en Sucre para curarse de una pulmonía, recibió un cajón de libros, entre los que se encontraba *El origen de las especies*, que él mismo calificó como "regalo indescifrable" (2). Ya en 1981 nos encontramos un artículo con verdades poéticas titulado *Cómo sufrimos las flores* (3).

Algo similar ocurre con la medicina, cuando narra cuadros clínicos de envenenamiento, prolapso de matriz, hemorragias digestivas, autopsias, cataratas, etc. Por tanto, no es de extrañar que algunos investigadores realicen estudios que resaltan la implicación del campo de la medicina en la narrativa de García Márquez (4,5). En estos trabajos subyace el objetivo común de ser ejemplos de cómo se puede usar la literatura en la educación científica. Hay personas se preguntarán si son útiles este tipo de análisis en estudios científico-técnicos. Como respuesta diremos que en un tercio de las facultades de medicina de Estados Unidos se cuenta con la posibilidad de estudiar literatura relacionada con la profesión, dado que la ficción o la realidad literarias narran y ofrecen una visión diferente y complementaria a lo que se ha aprendido en el ámbito académico (6). En este sentido, Esteva de Sagrera (7) escribe en *La Farmacia en el Quijote* lo siguiente: uno de los colegas del médico británico Thomas Sydenham -1624-1689- le preguntó qué libro deberían leer los estudiantes de medicina y Sydenham contestó que leyese el *Quijote*, un texto admirablemente escrito y con un gran conocimiento de los seres humanos y de su flaquezas, padecimientos y dolencias. Esta metodología de aprendizaje fomenta el interés del alumno. En consonancia con el argumento recién expuesto, tenemos que puntualizar que los estudios de Farmacia en España no han perdido aún su carácter "renacentista", aúnan conocimientos de muchas áreas, por lo que lo dicho aquí, puede ser bienvenido.

Teniendo en cuenta estos antecedentes hemos considerado la oportunidad de realizar este artículo, escrito de forma no lineal, para contribuir a que el farmacéutico recuerde o descubra a través

de varias novelas de García Márquez: plantas de carácter medicinal -ya sea por alusión directa de las mismas o por sus derivados terapéuticos-, productos de síntesis química y aspectos farmacéuticos de índole general, todo ello escrito en una prosa cautivadora y en un marco cultural y geográfico privilegiados, como es el caribe natal del autor colombiano.

Como se discutirá a lo largo del trabajo, no se persigue hacer un mero compendio de remedios con base científica -que puede ser que no exista o no haga falta siquiera-, más bien se pretende conseguir una "Mirada Farmacéutica" de la obra de García Márquez y su realismo mágico, llena de metáforas, ironías, situaciones alucinantes y divertidas, entre otros mensajes.

La elección de García Márquez para este trabajo no ha sido aleatoria. Distintos autores de realismo mágico muestran interés por la naturaleza, como el caso de Alejo Carpentier, en *El siglo de las luces* (8) describe en una pequeña "clase de botánica" cómo es una ceiba -Ceiba pentandra- considerada por los negros como "la madre de todos los árboles" (p.146-147). La profusión de plantas que aparece en las novelas de García Márquez, supera con mucho a lo que podemos encontrar, por poner un ejemplo, en obras de Vargas Llosa, así mismo premio Nobel. Este último autor, en *La ciudad y los perros* (9), *La Guerra del fin del Mundo* (10) o *El sueño del celta* (11) nos transporta de manera magistral al lugar físico y geográfico de los acontecimientos que narra, pero de una forma general. De esta manera, en *La Ciudad...* los personajes contemplan cada día un paisaje en apariencia desértico y están sometidos a esa lluvia imperceptible y plúmbea como es la garúa de Lima, en *La Guerra...* nos habla de la Caatinga brasileña como una región árida en la que domina el matorral espinoso y plantas suculentas y en *El Sueño...*, nos sumerge en una exuberante vegetación y clima agobiantes del Congo belga y de la Amazonía para explicarnos la extracción del caucho, pero en ninguno de los tres casos se detiene en alusiones concretas de plantas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han leído novelas emblemáticas de Gabriel García Márquez y se ha señalado según aparece en la narración: aquello relacionado con las plantas con una posible acción (terapéutica, tóxica, venenosa o con un efecto fisiológico observable), con la farmacia y con otros medicamentos de origen químico. Sobre estas anotaciones se realizan las consideraciones oportunas y se acompañan de citas textuales de las novelas.

Las obras escogidas son: *Cien años de soledad* (12), *Amor en los tiempos del cólera* (13), *El coronel no tiene quien le escriba*



(14), *El otoño del patriarca* (15), *Crónica de una muerte anunciada* (16) y *El general en su laberinto* (17). En la mayoría de estas novelas no aparecen datos históricos ni referencias geográficas concretas, pero de su lectura se desprende que transcurren en el Caribe Colombiano durante el siglo XIX y primera mitad del XX. El criterio para seleccionar estas novelas ha sido obtener una muestra representativa del autor, basada en su relación de novelas más vendidas y leídas (18,19). Hemos incluido, permítannos la licencia", la novela *El general en su laberinto*, que en su día creó grandes disputas entre historiadores colombianos y venezolanos, llegando a decirse que esta obra había sido escrita de una forma que satisficiera a Fidel Castro [20]

3. RESULTADOS

3.1 Consideraciones biográficas sobre García Márquez

En una entrevista periodística realizada a García Márquez en 1996, el escritor dice: "no hay una sola línea en mis libros que no surja de un hecho verdadero que conocí o que me contaron, o que he vivido" (21), por ello hemos recurrido a su novela autobiográfica *Vivir para contarla* (2) para poner en contexto los resultados que aquí se recogen, y extraerle el mayor jugo posible.

Debemos tener ante todo en cuenta que el autor escribe novelas, no tratados científicos, y en muchos casos, la narración puede tener primeras y segundas derivadas, que son descubiertas y discutidas por hermeneutas filólogos, políticos e historiadores. Nosotros intentaremos realizar algunas interpretaciones, sabiendo que las narraciones están construidas bajo la clave de la corriente del realismo mágico: donde la realidad y la ficción se compaginan de forma natural y se recurre a metáforas y a cargas de ironía -en este punto recomendamos la lectura de aceptación del Premio Nobel en 1982, todo un alegato sobre la identidad de América Latina, no exento de un espíritu reivindicativo en contra de la injusticia social (22). A continuación, se reproduce el siguiente párrafo de dicho discurso:

"No obstante, los progresos de la navegación que han reducido tantas distancias entre nuestras Américas y Europa, parecen haber aumentado en cambio nuestra distancia cultural. ¿Por qué la originalidad que se nos admite sin reservas en la literatura se nos niega con toda clase de suspicacias en nuestras tentativas tan difíciles de cambio social? ¿Por qué pensar que la justicia social que los europeos de avanzada tratan de imponer en sus países no puede ser también un objetivo latinoamericano con métodos distintos en condiciones diferentes? No: la violencia y el dolor desmesurados de nuestra historia son el resultado de injusticias seculares y amargas

sin cuento, y no una confabulación urdida a tres mil leguas de nuestra casa. Pero muchos dirigentes y pensadores europeos lo han creído, con el infantilismo de los abuelos que olvidaron las locuras fructíferas de su juventud, como si no fuera posible otro destino que vivir a merced de los dos grandes dueños del mundo. Este es, amigos, el tamaño de nuestra soledad".

El autor nació en Aracataca -Colombia- en 1927. Allí pasa su infancia con sus abuelos, asistidos por dos indios guajiros en una casa, "de bahareque y techos de palma amarga, con una salita amplia y bien iluminada, un comedor en forma de terraza con flores de colores alegres, dos dormitorios, un patio con un castaño gigantesco, un huerto bien plantado..." (2) (p. 41).

García Márquez era hijo de Gabriel Eligio, natural Cartagena de Indias que se ganaba la vida con el oficio de telegrafista, después de dejar sus estudios de medicina y farmacia por falta de recursos -durante el siglo XIX y primera mitad del XX, los estudios de farmacia en Colombia estaban ligados - estaban ligados a los de medicina a los de medicina los dos o tres de los primeros años- (23). A lo largo de su vida instaló cinco farmacias. Así cuenta el narrador en su autobiografía (2) una de sus experiencias directas con la farmacia:

"La única prueba que me faltaba era viajar solo con mi papá, y la tuve completa cuando me llevó a Barranquilla para que lo ayudara a instalar la farmacia..." (p.142).

El padre más tarde obtuvo el título de médico homeópata, con la advertencia de que no podía "tomar parte de operaciones quirúrgicas ni tampoco se le permite ninguna actividad en el ejercicio de la alopatía" (5). Este método curativo aparece varias veces en *Cien...*: "El doctor Alirio Noguera había llegado a Macondo pocos años antes con un botiquín de globulitos sin sabor y una divisa médica que no convenció a nadie: *Un Clavo saca otro clavo*" (p.195-196). De esta forma el autor pretende transmitirnos su falta de creencia en esta manera de curar, que también puede deducirse del siguiente párrafo autobiográfico (2):

"Papá flotaba en un aire de buen humor, con el consultorio repleto y la farmacia bien surtida, sobre todo los domingos en que llegaban los pacientes de los montes vecinos. No sé si supo nunca que aquella afluencia obedecía en efecto a su fama de buen curador, aunque la gente del campo no se la atribuía a las virtudes homeopáticas de sus globulitos de azúcar y sus aguas prodigiosas, sino a sus buenas artes de brujo" (Pág.179).

Después de la muerte de sus abuelos la vida del escritor pasa por Barranquilla, Bogotá -donde comienza a trabajar de periodista-, París, España, Ciudad de Méjico... Se casó con Mercedes Barcha, *la Jirafa*, la hija de un boticario de Sucre amigo de su padre, a la que se refiere así en *Cien...*:



"Sólo tuve que recorrer dos cuadras para llegar hasta la estrecha botica de polvorientas vidrieras con pomos de loza marcados en latín, donde una muchacha con la sigilosa belleza de una serpiente del Nilo le despachó el medicamento" (p.507), "y casi siempre entre los pomos de loza y el aire de valeriana de la única botica que quedaba en Macondo, donde vivía Mercedes, la sigilosa novia de Gabriel" (p. 542).

A toda esta trascendencia familiar, habría que sumar las vivencias del autor en la farmacia Barbosa, dado que a partir de sus conversaciones con el farmacéutico se gestaría parte de sus líneas maestras que recorren toda su literatura. En esa farmacia se veían a escondidas sus padres durante el noviazgo (24).

El narrador también mantuvo durante toda su vida estrechas relaciones con toda clase de médicos y contaba en su círculo de amistades con expertos ginecólogos, psiquiatras, médicos generales, forenses... , a los que atosigaba con toda clase de preguntas de índole médico (5). Una de las relaciones más destacables fue con Danilo Bartulín, médico personal de Salvador Allende, quien redactó de forma íntegra la autopsia que le hicieron a Santiago Nasar en *Crónica...* (p.87-89). Nuestro autor apenas alteró la redacción, tanto introdujo detalles para mejorar la calidad literaria, como que la realizó el cura del pueblo con la ayuda del boticario que tomó las notas y un estudiante de medicina de primer año que estaba allí de vacaciones, entre otras cosas hallaron en el contenido del lodazal gástrico "una medalla de oro de la Virgen del Carmen que la víctima se había tragado a la edad de cuatro años" (p.88).

García Márquez está impregnado de vivencias familiares farmacéuticas y médicas y tiene la costumbre de documentarse hasta el extremo antes de escribir sus novelas, de modo que, aunque posiblemente no sea su última pretensión, es un hecho de que parte de los remedios farmacéuticos que emplea tienen una base científica o empírica que vamos a comentar en algunos casos. Según Dasso Saldivar, biógrafo de Gabo, refiere en *El viaje a la semilla*, que allá por la década de los 60, mientras *Cien años de soledad* empezaba a tomar forma, la mesa de trabajo del escritor estaba repleta de «manuales de medicina casera, crónicas sobre las pestes medievales, manuales de venenos y antídotos" (5). El mismo narrador refiere en su autobiografía (2) lo siguiente: "en tiempos de hambruna llegué a leer desde tratados de cirugía hasta manuales de contabilidad, sin pensar que habrían de servirme para mis aventuras de escritor" (p.451).

Esta relación con el mundo de la medicina se traduce en la aparición de un médico como uno de los personajes principales en *Amor...*, el doctor Juvenal Urbino, que viaja a París para formarse en la profesión y regresa al Caribe con la sabiduría más mo-

derna de la época, dejando atrás praxis médicas desfasadas, y comenzando a tratar las enfermedades científicamente según su etiología. El doctor Urbino hace uso de su reputación para impulsar de iniciativas cívicas, como la construcción de un acueducto para mejorar de la calidad del agua y otras mejoras de salubridad pública:

"Su obsesión era el peligroso estado sanitario de la ciudad. Apeló a las instancias más altas para que cegaran los albañales españoles, que eran un inmenso vivero de ratas, y se construyeran en su lugar alcantarillas cerradas cuyos desechos no desembocaran en la ensenada del mercado, como ocurría desde siempre, sino en algún vertedero distante. Las casas coloniales bien dotadas tenían letrinas con pozas sépticas, pero las dos terceras partes de la población hacinada en barracas a la orilla de las ciénagas hacía sus necesidades al aire libre. Las heces se secaban al sol, se convertían en polvo, y eran respiradas por todos con regocijos de pascua en las frescas y venturosas brisas de diciembre. El doctor juvenil Urbino trató de imponer en el Cabildo un curso obligatorio de capacitación para que los pobres aprendieran a construir sus propias letrinas. Luchó en vano para que las basuras no se botaran en los manglares, convertidos desde hacía siglos en estanques de putrefacción, y para que se recogieran por lo menos dos veces por semana y se incineraran en despoblado" (p. 160).

"Era consciente de la acechanza mortal de las aguas de beber. La sola idea de construir un acueducto parecía fantástica, pues quienes hubieran podido impulsarla disponían de aljibes subterráneos donde se almacenaban bajo una espesa nata de verdín las aguas llovidas durante años. Entre los muebles más preciados de la época estaban los tinajeros de madera labrada cuyos filtros de piedra goteaban día y noche dentro de las tinajas... El agua era vidriada y fresca en la penumbra de la arcilla cocida, y dejaba un regusto de floresta... Pero el doctor Juvenal Urbino no incurría en estos engaños de purificación, pues sabía que a despecho de tantas precauciones el fondo de las tinajas era un santuario de gusarapos... De modo que pasó mucho tiempo antes de que aprendiera que los gusarapos eran en realidad las larvas de los zancudos, pero lo aprendió para no olvidarlo jamás, porque desde entonces se dio cuenta de que no sólo ellos sino otros muchos animes malignos podían pasar intactos a través de nuestros cándidos filtros de piedra" (p.161).

3.2 Enfermedades de la época

Si nuestro objetivo principal es obtener una "Mirada Farmacéutica" en una muestra representativa de la narrativa de García Márquez, parece oportuno desarrollar unos breves apuntes sobre las enfermedades más comunes de la época, al menos las que nombra el



autor. Para ello hay que tener en cuenta que Colombia es conocido como el país de la megadiversidad y posee un clima tropical muy matizado por sus diferentes altitudes (1), algo que condiciona la expansión de las epidemias y prevalencia de enfermedades. Un ejemplo muy claro es el paludismo, que existe en todavía en algunas zonas rurales de Colombia, pero afecta a poca población, dado que la mayoría de la gente vive a más de 1500 metros de altura -donde el riesgo de transmisión de la enfermedad es menor- y además existen tratamientos combinados -higiene pública, menor índice de vulnerabilidad y medicamentos- (25), estos últimos ya recomendados por Celestino Mutis, cuando en 1785 recomendaba "quina a puñados" (26).

En siglos anteriores, la región se vio afectada por la viruela, bocio, focos de fiebre amarilla, malaria y lepra, siendo contenidas más o menos las dos primeras por fenómenos de inmunización o autoinmunización (25). Pasando a la época que nos ocupa -siglo XIX y primera mitad del siglo XX-, el autor nombra la lepra, la filariasis árabe, el cólera y la gonorrea.

La lepra -*Mycobacterium leprae*- es una enfermedad asociada a condiciones de pobreza, hambre y guerras, en el caso de Colombia se llegó a decir que el país era la primera "potencia mundial de leprosos" (27), caso que no pasa inadvertido para el narrador y hace referencia al lazareto de Cartagena de Indias y a la vivencia siguiente:

"El embajador Palmerston, uno de los últimos diplomáticos que le presentó las cartas credenciales... contaba en sus memorias prohibidas... nadie me dio razón de nada en alcabalas y oficinas y tuve que valerme de los leprosos y los paralíticos que ya habían invadido las primeras habitaciones privadas" (*El otoño...*, p.99-100).

La elefantiasis árabe o potra es una hernia de escroto causada por una filaria (*Wuchereria bancrofti*) transmitida por mosquitos que viven en aguas estancadas y no tratadas. Entonces no tenían tratamiento farmacológico, aunque se usaron decocciones de orquídeas y aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) sin éxito, "si bien los potrosos soportaban esta enfermedad no sólo sin pudor sino inclusive con cierta insolencia patriótica" (28). De *El otoño...*, recogemos el siguiente párrafo:

"y él alegaba muerto de risa que si Dios es tan macho como usted dice dígame que me saque este cucarrón que me zumba en el oído, le decía, se desabotonaba los nueve botones de la bragueta y le mostraba la potra descomunal, dígame que me desinfele esta criatura, le decía, pero el nuncio lo pastoreaba con un largo estoicismo" (p.26).

En 1849 y 1850 hubo en Cartagena de Indias una epide-

mia de cólera -*Vibrio cholerae*- en la que murió una cuarta parte de la población. La enfermedad se contraía consumiendo agua o alimentos contaminados por las heces de las personas que tienen este mal. Recordemos que no había ni antibióticos ni vacunas y la única forma de tratamiento era la cuarentena (29), que en Amor..., no es una cuarentena sino un sitio que se anunciaba con banderas amarillas en los barcos y un cañonazo cada cuarto de hora:

"Desde que se proclamó el bando del cólera, en el alcázar de la guarnición local se disparó un cañonazo cada cuarto de hora, de día y de noche, de acuerdo con la superstición cívica de que la pólvora purificaba el ambiente. El cólera fue mucho más encarnizado con la población negra, por ser la más numerosa y pobre, pero en realidad no tuvo miramientos de colores ni linajes. Cesó de pronto como había empezado, y nunca se conoció el número de sus estragos, no porque fuera imposible establecerlo, sino porque una de nuestras virtudes más usuales era el pudor de las desgracias propias" (p.164-165).

La gonorrea o blenorragia -*Neisseria gonorrhoeae*- es una enfermedad que aparece de forma recurrente en las novelas estudiadas, y será descrita en la parte final de este trabajo.

3.3 Remedios de origen vegetal

Con el propósito de hacer más asimilable los contenidos que aparecen en este trabajo, pasamos a comentar las plantas usadas - demás remedios- reunidas en grupos temáticos en función de su naturaleza. Al final del texto aparece una tabla con el nombre científico de las plantas nombradas.

En *El otoño...* aparece el siguiente párrafo:

"y cultivando plantas de botica para las emergencias de los vecinos que la despertaban a medianoche con que tengo un espasmo de vientre, señora, y ella les daba a masticar semillas de mastuerzo, que al ahijado tiene el ojo torcido, y ella le daba un vermífugo de epazote, que me voy a morir, señora, ero no se morían porque ella tenía la salud en la mano" (p.166).

El autor emplea el mastuerzo, con acción de tónico estomacal según Font-Quer (30), el epazote o paico, un vermífugo muy potente (31). Parece indicar que a los mastuerzos -necios y zafios- los trata con semillas de la planta con el mismo nombre, y al ojo torcido -posiblemente se refiere a zurumbático o persona lela o pasmada- les aplica un purgante fuerte. El mismo autor, en su ambigüedad calculada, manifiesta su "confianza" en las plantas medicinales, cuestión que pone en duda en otros sucesos como veremos más adelante.

En *Cien...* aparecen remedios vegetales caseros: jarabe de totumo, agua de bija, pócimas de paico y aceite de ricino para



desparasitar, árnica para las hinchazones, ají picante y ruibarbo para el vicio de comer tierra -geofagia-, gotas de acónito para la peste del insomnio, cataplasma de mostaza para burlar la fertilidad. Algunos de estos remedios se han usado por sus propiedades reconocidas (30). En el caso del ruibarbo el autor nos deja con la duda, y el empleo de la mostaza y acónito, es una mera invención.

"Estos niños andan como zurumbáticos -decía Úrsula-. Deben tener lombrices.» Les preparó una repugnante pócima de paico machacado, que ambos bebieron con imprevisto estoicismo, y se sentaron al mismo tiempo en sus bacinillas once veces en un solo día, y expulsaron unos parásitos rosados que mostraron a todos con gran júbilo" (p.115).

"Su padre le dio con el revés de la mano un violento golpe en la boca que le hizo saltar la sangre y las lágrimas. Esa noche Pilar Ternera le puso compresas de árnica en la hinchazón" (p.114). Una manera mediante la cual nos recuerda lo importante que es el respeto materno, inconcebible en la actualidad.

"Echaban hiel de vaca en el patio y untaban ají picante en las paredes, creyendo derrotar con esos métodos su vicio pernicioso, pero ella dio tales muestras de astucia e ingenio para procurarse la tierra, que Úrsula se vio forzada a emplear recursos más drásticos. Ponía jugo de naranja con ruibarbo en una cazuela que dejaba al sereno toda la noche, y le daba la pócima al día siguiente en ayunas". Aunque nadie le había dicho que aquél era el remedio específico para el vicio de comer tierra, pensaba que cualquier sustancia amarga en el estómago vacío tenía que hacer reaccionar al hígado... Rebeca era tan rebelde y tan fuerte a pesar de su raquitismo, que tenían que barbearla como a un becerro para que tragara la medicina. Cuando Úrsula lo supo, complementó el tratamiento con correazos. No se estableció nunca si lo que surtió efecto fue el ruibarbo a las tollinas, o las dos cosas combinadas, pero la verdad es que en pocas semanas Rebeca empezó a dar muestras de restablecimiento" (p.131-132).

Como se ha referido, el autor nos deja en la indefinición o muestra una ambigüedad calculada, puesto que en la su autobiografía (2) cuenta cómo un médico de la compañía bananera le dio una pócima de ruibarbo para una amigdalitis que le provocó una crisis de vómitos (p.93).

Otro aspecto que trata el narrador es la anticoncepción. En *Cien...*, la pitonisa Pilar Ternera tiene algunos remedios como la mostaza, un condimento muy de olor fuerte y usado en todo el mundo y especialmente en Francia, pero sin el efecto que se le atribuye, por lo que puede ser que el autor las use como un recurso que le recuerda a su etapa en dicho país, como también recordaría el olor a coliflores hervidas y castañas asadas (*Amor...*, p.139):

"Pilar Ternera... Le enseñó además cómo prevenir la concepción indeseable mediante la vaporización de cataplasmas de mostaza, y le dio recetas de bebedizos que en casos de percances hacían expulsar «hasta los remordimientos de conciencia" (p.410).

Una discusión más extensa tiene el episodio sobre la peste del insomnio. "Habían contraído, en efecto, la enfermedad del insomnio. Lo más temible de la enfermedad no era la imposibilidad de dormir, pues el cuerpo no sentía cansancio alguno, sino su inexorable evolución hacia una manifestación más crítica: el olvido..., hasta hundirse en una idiotez sin pasado.... Al principio nadie se alarmó... Cuando José Arcadio Buendía se dio cuenta de que la peste había invadido el pueblo, reunió a los jefes de familia para explicarles lo que sabía sobre la enfermedad del insomnio, y se acordaron medidas para impedir que el flagelo se propagara a otras poblaciones... Todos los forasteros que por aquel tiempo... que recorrían las calles de Macondo tenían que hacer sonar su campanita para que los enfermos supieran que estaba sano. No se les permitía comer ni beber nada durante su estancia, pues no había duda de que la enfermedad sólo se transmitía por la boca, y todas las cosas de comer y de beber estaban contaminadas de insomnio. En esa forma se mantuvo la peste circunscrita al perímetro de la población. Úrsula, que había aprendido de su madre el valor medicinal de las plantas, preparó e hizo beber a todos un brebaje de acónito, pero no consiguieron dormir, sino que estuvieron todo el día soñando despiertos..." Pero el visitante -el gitano Melquiades- advirtió su falsedad. Entonces comprendió. Abrió la maleta atiborrada de objetos indescifrables, y de entre ellos sacó un maletín con muchos frascos. Le dio a beber a José Arcadio Buendía una sustancia de color apacible, y la luz se hizo en su memoria. Los ojos se le humedecieron de llanto"

Este largo extracto sobre la peste del insomnio, que aconsejamos a leer en toda su extensión *Cien...*, (p.133-140), sí ofrece varias derivadas. Por una parte, el narrador nos puede estar hablando de una demencia o un posible Alzheimer, recordemos García Márquez tenía antecedentes familiares de estas patologías (32) - en *Amor...* volverá a hablar de ellas cuando Tránsito Ariza terminó sin recuerdos, con la memoria casi en blanco- (p.249-250)- a las que Úrsula intentó tratar sin éxito con un potente tóxico como es el acónito. El mismo autor recibió una carta de un médico que aseguraba haber visto un caso así, al que respondió como hemos dicho antes: me lo inventé, fue una "mamada de gallo". El mismo Sánchez-Torres relaciona por otra parte la virtud curativa con el color del agente terapéutico que sacó del maletín, algo poético que la alopatía no ha tenido en cuenta, pero que no hay que despreciar (5). Pero más actualidad cobra, si cabe, este episodio cuando



se compara con la epidemia causada por el SARS-CoV-2. El *New York Times* (33) ha recordado este episodio como la Pandemia de la Soledad, el que están viviendo millones de personas en el mundo en la actualidad. También se ha realizado de forma altruista un corto metraje sobre la peste del insomnio por treinta actores latinoamericanos, como signo de ánimo y esperanza en medio de esta crisis sanitaria y económica (34).

En este trabajo ya se ha hablado de la presencia un médico en *Amor...*, el doctor Juvenal Urbino, quien, junto a Fermina Daza y Florentino Ariza, forman un el trío amoroso, eso sí el último personaje debe esperar "cincuenta y tres años, siete meses y once días con sus noches" (p.495), mientras tanto toma, infusiones de flores de tilo para entretener los nervios" (p. 95-96), y se mantiene virgen a su manera: "Decían que usaba una pomada de veneno de víbora que enardecía la silla turca de las mujeres, pero él juraba no tener recursos distintos de los que Dios le había dado. Decía muerto de risa: "Es puro amor" (p.98). El mismo Florentino Ariza, después de probar todo tipo de remedios para frenar su calvicie, acude al Portal de los Escribanos -donde mezclan mestizos, criollos, negros, árabes, indios, aventureros- y en principio, los remedios son de dudosa eficacia:

"Recurrió por último a cuantas yerbas de indios pregonaban en el mercado público, y a cuantos específicos mágicos y pócimas orientales se vendían en el Portal de los Escribanos" (p.374).

En realidad, parece que Florentino Ariza acude a la desesperada para curar algo, que todavía hoy día tiene un tratamiento farmacológico con éxito relativo. ¿Quiere decir esto que el autor desprecia remedios "milagro" o "sin argumento" que sólo usarían las clases sociales más pobres? Resulta difícil saberlo. De nuevo, el autor nos devuelve a su ambigüedad, dado que en su autobiografía califica a su padre como "brujo" a la hora de tratar enfermedades. Las artes de brujo o "ritos de fatalidad" también las cita el autor como las realizadas en los palenques - refugios de fugitivos y esclavos-:

"El general Montilla le contó que estaban envenenando a los perros de la calle para impedir la propagación de la rabia. Sólo habían logrado capturar a dos de los niños mordidos en el barrio de los esclavos. Los otros, como siempre, habían sido escondidos por sus padres para que murieran bajo sus dioses, o-se los llevaban a los palenques de cimarrones en los pantanos de María- labaja, adonde no alcanzaba el brazo del gobierno, para tratar de salvarlos con artes de culebreros" (*El general...*, p.178-179).

En una situación antónima con el apartado anterior, el autor nos muestra a un doctor Urbino, "como caro y excluyente, y su clientela estuvo concentrada en las casas solariegas del barrio de los Virreyes" (*Amor...*, p.21). Receta tabonucos para la tos, pape-

lillos de quinina para las fiebres tercianas, y otros medicamentos de origen químico de los que hablaremos al final del trabajo. Con el tiempo se va volviendo escéptico y sus actitudes hacia la medicina fueron cambiando a lo largo de su el tiempo:

Es un "médico excelente, capaz de saber lo que tenía un enfermo sólo por su aspecto, y cada vez desconfiaba más de los medicamentos de patente" (p.21), una reclamación, creemos que no una sospecha, insertada por el narrador en contra de estos medicamentos que son más caros y no disponibles para toda la población. "En todo caso -solía decir en clase- la poca medicina que se sabe sólo la saben algunos médicos... por lo que de sus entusiasmos juveniles había pasado a una posición que él mismo definía como un humanismo fatalista" (p.21). El propio autor cuenta en su autobiografía (2) lo siguiente: "Pues mire usted, comadre -concluyó-. Médico soy, y aquí me tiene usted, sin saber cuántos de mis enfermos se han muerto por la voluntad de Dios y cuántos por mis medicinas" (p.38).

Veamos a continuación, cómo el narrador se vale de las reales o supuestas virtudes medicinales de las plantas y otros medicamentos, para construir el personaje de un médico posiblemente hipocondriaco, polimedicado y que sigue una dieta estricta para retrasar su vejez:

"Se levantaba con los primeros gallos, y a esa hora empezaba a tomar sus medicinas secretas: bromuro de potasio para levantarse el ánimo, salicilatos para los dolores de los huesos en tiempo de lluvia, gotas de cornezuelo de centeno para los vahídos, belladona para el buen dormir. Tomaba algo a cada hora, siempre a escondidas, porque en su larga vida de médico y maestro fue siempre contrario a recetar paliativos para la vejez: le era más fácil soportar los dolores ajenos que los propios. En el bolsillo llevaba siempre una almohadilla de alcanfor que aspiraba a fondo cuando nadie lo estaba viendo, para quitarse el miedo de tantas medicinas revueltas" (p.18-19).

"Desayunaba en familia, pero con un régimen personal: una infusión de flores de ajeno mayor, para el bienestar del estómago, y una cabeza de ajos cuyos dientes pelaba y se comía uno por uno masticándolos a conciencia con una hogaza de pan, para prevenir los ahogos del corazón" (p.20).

Además de construir un personaje, el narrador nos brinda una metáfora como es la almohadilla de alcanfor, que sirve para evitar los efectos adversos e interacciones entre tantas medicinas juntas. También nos habla de una dieta sana y de las exageraciones u obsesiones que pueden tener algunas personas con este aspecto, como es el comerse todos los días una cabeza de ajo. En definitiva, el doctor Urbino vive más de ochenta años, pero no es inmortal a



pesar de su dieta y automedicación, acaba muriendo de una forma "absurda" como es caerse de espaldas de una escalera arrimada a la copa de un mango cuando intentaba rescatar a un loro doméstico manglero -al que había que ponerle supositorios de trementina- que se había escapado de la cocina de su casa.

3.4 Especies

Las especias son productos vegetales aromáticos que sirven como condimento. En Europa se empleaba el azafrán, laurel, mostaza, orégano, tomillo u otras plantas de diversa procedencia, naturalizadas en el mediterráneo como el perejil, cilantro, comino, sésamo, ajo, etc. Sin embargo, estas plantas son insípidas y aportan menos sabor en comparación con las especias. Lo que consideramos como especias se encontraban en el paleotrópico, en las Islas Molucas, Sri-Lanka, etc. El clavo de olor y la nuez moscada son las dos especias principales, a las que habría que sumar otra lista no muy extensa: pimienta, canela, anís estrellado, jengibre... La búsqueda de estas especias, que llegaban a valer su peso en oro, originó dos viajes oceánicos, el viaje de Colón y la vuelta al mundo de Magallanes. Hoy día su cultivo se ha extendido por todos los trópicos. Estas sustancias, a una determinada dosis, producen un efecto fisiológico (35). García Márquez describe en *Amor...* de forma magistral a este grupo de derivados de las plantas cuando Fermina Daza compra especias y condimentos en el Portal de los Escribanos de Cartagena de Indias:

"En la tienda de especias, por el puro placer del olfato, estrujó hojas de salvia y orégano en las palmas de las manos, y compró un puñado de clavos de olor, otro de anís estrellado, y otros dos de jengibre y de enebro, y salió bañada en lágrimas de risa de tanto estornudar por los vapores de la pimienta de Cayena. En la botica francesa, mientras compraba jabones de Reuter y agua de benjuí" (p.149-150).

No podemos saber si es una casualidad que Fermina Daza compre cosas caras como las especias en un lugar que no le "corresponde" por su alcurnia -aunque tenga carácter de mula- como es el Portal de los Escribanos, y deje para la farmacia cosas más superfluas. Es posible que se trate de una contraposición entre lo "auténtico" y rancio en la que la protagonista disfruta de lo "fantástico" y cosmopolita, frente a algo más elegante y distinguido como la botica francesa.

3.5 Sustancias psicoactivas, tabaco y estupefacientes

Consideraremos aquí como sustancias psicoactivas a las bases xánticas: cafeína, teofilina y teobromina. En mayor o menor medida son estimulantes del sistema nervioso central, estimulantes

cardiorrespiratorios y diuréticos. Aunque la cafeína se puede extraer de otras plantas, la principal fuente es la semilla de café, un arbusto originario de Abisinia y extendido por todo el trópico. El narrador nombra con frecuencia el café, a veces en forma de café cerrero: "llevó al cuarto un termo de café espeso como el petróleo crudo" (*Amor...*, p.414). Las contraindicaciones que tiene el abuso de café las conoce el doctor Urbino quien, en su preocupación por mantener la salud, dice que "el café es veneno" (*Amor...*, p.272), tampoco bebe manzanilla porque dice que "esa vaina sabe a ventana" (*Amor...*, p.317) e incluso llega a pensar lo siguiente: "Pensaba que con un criterio estricto todo medicamento era veneno, y que el setenta por ciento de los alimentos corrientes apresuraban la muerte. "En todo caso -solía decir en clase... que "muchos medicamentos adelantan la muerte" (*Amor...*, p.21).

El té es igualmente un arbusto, originario del norte de la India y del Sur de China. En Europa se introdujo en el siglo XVIII y en países como Inglaterra se popularizó su consumo, pero no así en España y en muchas de sus colonias, esto fue lo que dijo la madre del doctor Urbino cuando se trataba de imponer esta bebida a la hora de la merienda:

"Cuando hizo las primeras invitaciones para tomar el té a las cinco de la tarde, con galletitas imperiales y confituras de flores, de acuerdo con una moda reciente en Inglaterra, doña Blanca se opuso a que en su casa se bebieran medicinas para sudar la fiebre en vez del chocolate con queso fundido y ruedas de pan de yuca" (*Amor...*, p.297). Suponemos que con esta frase está reivindicando lo autóctono americano, el chocolate -cacao y el tubérculo de yuca -también llamada mandioca- en contra de algo más refinado, medicinal, "imperial" y extranjero.

El autor define al cacao, originario de América Central, como árbol "de grandes hojas persistentes y flores encarnadas y frutos de baya cuyas semillas se usaban como principal ingrediente del chocolate" (*El otoño...*, p.170). Veamos, dentro de lo que supone la técnica del realismo mágico, cómo el párroco de Macondo, presionado por los feligreses, demuestra la existencia de Dios mediante el chocolate -derivado del cacao-:

"Un momento -dijo-. Ahora vamos a presenciar una prueba irrefutable del infinito poder de Dios. El muchacho que había ayudado a misa le llevó una taza de chocolate espeso y humeante que él se tomó sin respirar. Luego se limpió los labios con un pañuelo que sacó de la manga, extendió los brazos y cerró los ojos. Entonces el padre Nicanor se elevó doce centímetros sobre el nivel del suelo" (*Cien...*, p. 178).

El párrafo anterior parece una filmación a modo de las que aparecen en los evangelios cristianos. De nuevo se sirve de una



planta nativa, el jefe espiritual cristiano de la "tribu" ha ascendido un poco al cielo, sólo doce centímetros. El responsable es el un vaso de una bebida que proviene del cacao -*Theobroma*- que literalmente quiere decir alimento de los dioses. Para hacerlo más verosímil, es posible que García Márquez introduzca de manera periodística la cifra de doce centímetros, que puede no ser aleatoria, en tanto en cuanto que este número posee connotaciones bíblicas.

El interés farmacológico del tabaco hay que encuadrarlo en razones históricas, cuando en el siglo XV, el uso del tabaco por las poblaciones indígenas fue observado por Cristóbal Colón y la planta fue llevada por primera vez a Europa. Entonces se consideraba que todas las hierbas tenían propiedades terapéuticas potenciales y esta nueva se usó para tratar un amplio rango de dolencias -catarro, resfriados y fiebres, como una ayuda a la digestión y en la prevención del hambre y la sed; como purgante y narcótico- (36). El propio autor era un fumador de hasta seis cajetillas mientras escribía Cien años de soledad, en su autobiografía (2) se refiere al tabaquismo varias veces:

"Por la pulmonía me habían prohibido fumar... en Sucre, mientras trataba de leer sin pausas los libros recibidos, encendía un cigarrillo con la brasa del otro hasta que ya no podía más, y mientras más trataba de dejarlo más fumaba" (p.385).

"Una noche cualquiera, durante una cena casual en Barcelona, un amigo siquiátra les explicaba a otros que el tabaco era quizás la adicción más difícil de erradicar. Me atreví a preguntarle cuál era la razón de fondo, y su respuesta fue de una simplicidad escalofriante: -Porque dejar de fumar sería para ti como matar a un ser querido". (p.386).

y así se refiere al tabaquismo en sus novelas:

"escribía sin piedad, intoxicado de café cerrero, envenenado del tabaco rancio del cigarro que encendía con el cabo del anterior" (*El otoño...*, p.164).

"fumaba sin reposo unos cigarros de carretero que liaba con papel de estraza, y se los recetaba a sus enfermos contra toda clase de malentendidos del cuerpo. Los mismos pacientes decían que nunca los curaba por completo sino que los entretenía con su yerba florida. El soltaba una risa plebeya" (*El general...*, p.220). La coca, marihuana y burundanga las trataremos como elementos estupefacientes, que causan placer de distinto tipo y falsas impresiones sensoriales o alucinaciones. El narrador emplea la coca bajo la forma de coqueo, o empleo tradicional de los indígenas andinos que mastican bolas de coca (junto con cenizas alcalinas para liberar el alcaloide) por su efecto psicomotor, dado que reduce el cansancio y el hambre: "sentados, sin respirar, rumiando bolas de tabaco, bolas de coca, medicinas de parsimonia que les permitían sobrevivir

a tanta ignominia" (*El otoño...*, p.204). Una buena forma no sólo de describir esta práctica, sino de denunciar la práctica social identificada con este sector de la población.

Sin embargo, separa el coqueo del empleo de la marihuana y la burundanga, al que circunscribe en un contexto de tugurio o de cantina -menos lícito-, donde estas drogas están ligadas al contacto sexual o moroso: "dónde te habrás perdido en la parranda sin término del maranguango y la burundanga" (*El otoño...*, p.85). Queremos recordar que esta última planta es rica en escopolamina y a dosis bajas anula la voluntad y la memoria del individuo (37).

3.6 Tóxicos y venenos

Recordemos la famosa frase de Paracelso *dosis sola facit venenum* o la dosis hace al veneno. El arsenal médico del siglo XIX eran sustancias potencialmente tóxicas que contenían mercurio, plomo y arsénico. Uno de los productos muy usados era el Licor de Fowler -solución al 1% de ácido arsenioso- que se empleaba como antipirético contra el paludismo y otras muchas enfermedades (38).

En el último viaje de su vida "El Libertador" estaba muy enfermo y durante el mismo se aplicaron toda clase de remedios, recibió muchas drogas, pociones, cataplasmas y maniobras. Un resumen de las mismas, extraídos de *El general...*, podría ser: baños calientes con hojas de salvia y orégano, infusión de flores de tilo para calmar la tos, colirios de manzanilla para la supuración del lagrimal, gotas de belladona -para calmar alucinaciones-, infusión de amapolas con goma arábiga -como sedante-, quinina -para una posible malaria-, píldoras purgantes y lavativas de sen para su estreñimiento habitual, sinapismos en los pies, cantáridas -*Lytta vesicatoria*, vejigatorio para evacuar líquidos-. Para finalizar con este caso, en plena desesperación, llegó a plantearse algo exotérico, que aleja la mala suerte, como es un baño de cariaquito morado: "Algo habría que hacer", dijo. «Aunque fuera darnos un buen baño de cariaquito morado. Y no sólo nosotros: todo el ejército libertador" (p.136). Incluso el mismo Simón Bolívar deseó tener a mano un médico del que se decía que curaba más de trescientas enfermedades distintas a base de sábila (p.182). Todos los remedios vegetales fueron inútiles, e incluso tuvo que recurrirse a supersticiones como el cariaquito morado o a plantas panacea como la sábila.

Según Auwaerter y cols (39), Simón Bolívar murió de *Paracoccidioidomycosis* -*Paracoccidioidomyces brasiliensis*- complicada por una intoxicación crónica por arsénico. Estos autores se basan en un informe forense -no del todo público-, realizado a partir de fragmentos de hueso extraídos de los restos de Simón Bolívar en 2010 por orden de Hugo Chávez, para determinar si se trataba de un en-



venenamiento. En este momento ya sabemos que la pretensión de García Márquez es escribir novelas, no exentas de una documentación previa que la usa según le conviene. De esta forma pone en boca de "El General" su experiencia con el arsénico:

"-«Acabo de renunciar al poder por un vomitivo mal recetado, y no estoy dispuesto a renunciar también a la vida». Años antes había dicho lo mismo, cuando otro médico le curó unas fiebres tercianas con un brebaje arsenical que estuvo a punto de matarlo de disentería" (*El general...*, p.52).

El láudano también cobra protagonismo en algunas de las novelas. Se trata de una tintura muy diluida de opiáceos en vino o alcohol etílico no desnaturalizado con miel, azafrán, especias (40) y se usaba para todo tipo de dolores y era de uso doméstico, si bien a grandes dosis era tóxico. En narrador recurre a esta tintura como forma de suicidio. En su viaje de amor por el Río Magdalena entre Fermina Daza y Florentino Ariza, éste último recibió un telegrama en la que la joven América Vicuña se había suicidado por celos:

"América Vicuña, presa de una depresión mortal por haber sido reprobada en los exámenes finales, se había bebido un frasco de láudano que se robó en la enfermería del colegio" (*Amor...*, p.477-478).

La estricnina es un alcaloide presente en la semilla de la nuez vómica y es una sustancia letal a dosis de partes por millón. Pero el coronel Aureliano Buendía parece inmune a los efectos de esta sustancia, ya que después de sobrevivir a un pelotón de fusilamiento, a emboscadas, a atentados e intento de suicidio con un tiro en el pecho, "sobrevivió a una carga de estricnina en el café que habría bastado para matar un caballo" (*Cien...*, p.202). El autor establece la diferencia entre estos dos venenos y los dos personajes, un frasco que hay que tomar completo para provocar la muerte de una adolescente, pero para matar al coronel Aureliano Buendía necesita algo más contundente, una cantidad grande de estricnina como para matar un caballo, y no lo consigue.

El comienzo de *Amor...* dice así: "Era inevitable: el olor de las almendras amargas le recordaba siempre el destino de los amores contrariados... Se trataba de una urgencia por la que había sido llamado el doctor Juvenal Urbino, un caso que había dejado de ser urgente hace muchos años" (p.11).

El doctor atiende a un amigo suicida suyo, Jeremiah de Saint-Amour que había respirado vapores de cianuro de oro, porque no quería vivir ningún día más de cumplidos los 60 años por miedo a la vejez. Consideramos que es una metáfora preciosa y una entrada literaria muy brillante, en la aparecen las almendras amargas -medicinales en cantidades muy diluidas- cuya actividad se debe al ácido cianhídrico o ácido prúsico. Con independencia de consideraciones literarias, la belleza de esta entrada queda realzada por la capacidad sensorial que tiene el autor de transmitirnos el olor característico de esta planta, al mismo tiempo que leemos.

3.7 Sustancias químicas

Los medicamentos de naturaleza química o sintética que aparecen en las novelas son varios, podemos dividirlos en función de su naturaleza inorgánica y orgánica.

El permanganato de potasio diluido -en inyecciones o irrigaciones- era la forma más común de tratar las afecciones blenorragias en el siglo XIX y comienzos del XX (41) antes de que aparecieran las sulfamidas y después los antibióticos, como ya indicamos con anterioridad-. La gonorrea o blenorragia era enfermedad prevalente y atribuida a la "mala vida". Esta afección se ha relacionado en Colombia con el crecimiento de las ciudades, la aparición de una clase media, un proletariado urbano y un aumento de la prostitución en las ciudades (42), aunque décadas antes la enfermedad hacía estragos en los ejércitos de Simón Bolívar. Así describe el narrador estragos y el tratamiento de esta enfermedad:

En *Cien...*, Pilar Ternera somete a Aureliano Segundo a "unos ardientes lavados de permanganato y las aguas diuréticas, y ambos se curaron por separado después de tres meses de sufrimientos secretos" (p.300-301).

En *Cien...* parece ser un mal social, cuando los trabajadores de la bananera *United Fruit Company*, instalada en los alrededores de la Ciénaga y en toda Centroamérica, recibían asistencia médica. Sin embargo, el autor no desaprovecha la oportunidad de contar cómo hay médicos ajenos al juramento hipocrático, que tratan a las personas como recuas de ganado o como si fueran esclavos:

"Los médicos de la compañía no examinaban a los enfermos, sino que los hacían pararse en fila india frente a los dispensarios, y una enfermera les ponía en la lengua una píldora del color del piedralipe, así tuvieran paludismo, blenorragia o estreñimiento." (p.423).

En *Amor...*, Tránsito Ariza confundió el cólera con la gonorrea de su hijo: "Pero de todos modos se equivocaba, porque el hijo había tenido en secreto seis blenorragias" (p.313). El autor se "ríe" de un personaje que prometió conservar su virginidad, que se prolongaría sin él saberlo, nada menos que más de medio siglo, para entregársela a Fermina Daza.

A veces la enfermedad no se cura, sino es por medio de la cárcel, como le ocurrió en *Crónica...*, a uno de los hermanos Vicario -asesinos de Santiago Nasar-, un personaje animal, zafio y refractario a cualquier tratamiento, que sólo puede sanarse por métodos drásticos:

"Regresó con una blenorragia de sargento que resistió a los métodos más brutales de la medicina militar, y a las inyecciones de arsénico y las purgaciones de permanganato del doctor Dionisio Iguarán. Sólo en la cárcel lograron sanarlo" (p.71).



En *El general...*, Simón Bolívar, preguntando por las tropas, recibe como respuesta "«Lo que nos tiene jodidos no es la moral, Excelencia», le dijo. «Es la gonorrea» (p.241).

El ácido bórico es una molécula que podríamos considerar de droguería, que puede comprarse a granel, sin tener en principio, mucho cuidado con la dosis. Es desinfectante activo y poco tóxico que es incapaz de acabar con las cucarachas, ya perseguidas desde tiempos bíblicos y sólo susceptibles al deslumbramiento solar (*Cien...*, p.523), con el que el dictador Zacarías Alvarado se aseaba cada día -con grandes cantidades de este producto- la zona genital que incluía su enorme potra de la que el personaje estaba orgulloso: "le embadurnaba las bisagras de las piernas con manteca de cacao para aliviarle las escaldaduras del braguero, le empolvaba con ácido bórico la estrella mustia del culo" (*El otoño...*, p.194).

Otra molécula inorgánica era el bromuro de potasio que se tomaba como calmante del sistema nervioso y en situaciones neurasténicas (41); y era unas de las medicinas secretas que tomaba el doctor Juvenal Urbino para levantarse el ánimo (*Amor...*, p.18). Este dato aporta detalles sobre la personalidad del doctor Urbino, que por supuesto también está sujeto a bajadas de ánimo como el resto de los mortales.

En este sentido, durante el siglo XIX se lograron en Europa -y más tarde en los Estados Unidos- grandes avances en química orgánica de aplicación medicinal, como la extracción de alcaloides y la síntesis de moléculas como los salicilatos (43). Comienza el proceso de industria químico-farmacéutica, que en pocas décadas exportó sus medicamentos a distintas partes del mundo, lo que desembocó en el abandono progresivo de la formulación magistral basada en plantas medicinales.

En *Amor...*, ya hemos referido como el doctor Juvenal Urbino también tomaba salicilatos para el dolor de huesos en tiempos de lluvia (p.19). Una observación que resulta muy conspicua que nos brinda el autor sobre el mundo de la síntesis de medicamentos, los salicilatos fueron aislados en el siglo XVIII a partir de la corteza de sauce, con buenos resultados para la artritis y la fiebre, pero no fue hasta finales del siglo XIX cuando se acetilaron por la empresa Bayer para disminuir sus efectos secundarios y empezar a producirse en gran escala y destinarlos a la exportación (44). Tampoco hay que olvidar que el clima caribeño colombiano se caracteriza por un periodo largo de lluvias persistentes que comienza en abril - con una interrupción en julio- y sigue durante un largo invierno entre agosto y noviembre, y se interrumpe entre diciembre y marzo con un periodo seco (1). Medicamentos similares eran más costosos, como la fenaspirina -ácido fénico y aspirina- y sólo estaban dirigidos a las élites y su consumo se consideraba con un ejemplo

de distinción (45). Pero existen dos ejemplos más claros de esta discriminación, el cloroformo y la insulina. El cloroformo sólo aparece en *Amor...*, esta molécula también llamada "anestésico de la reina", se usó en 1847 para dormir a la Reina Victoria de Inglaterra en su octavo parto.

"Florentino Ariza sabía que los ricos de su tierra no tenían enfermedades cortas...Se sometían a lo que Dios quisiera en el Hospital de los Adventistas...Algunos volían con el abdomen atravesado de costuras bárbaras que parecían hechas con cáñamo de zapatero..., y por el resto de sus días seguían contando y volviendo a contar las apariciones angélicas que habían visto bajo los efectos del cloroformo" (*Amor...*, p.334). Con esta frase el narrador nos recuerda, igual que en el caso de las víctimas del cólera, algunos rasgos fundamentales de la existencia humana: los ricos no se mueren, simplemente desaparecen.

Por último, aparece la insulina que, aunque de un origen biológico, la incluimos en este apartado como fruto del progreso bioquímico. Esta molécula se empezó a comercializar en Hispanoamérica en el primer tercio del siglo XX (46). El narrador trata la diabetes en sus novelas de forma más o menos explícita, aunque en su familia parece ser que no hay antecedentes de la enfermedad (32).

En *Cien...*, los Buendía beben limonada y siempre el café sin azúcar. En *El Coronel* habla de una "pastilla blanca con tamaño de habichuela" para endulzar el café, "es como azúcar, pero sin azúcar... de una dulzura triste. Es algo así como repicar sin campanas" (p.59).

También se describe un análisis de orina a un diabético: "el coronel esperó hasta cuando el médico calentó el tubo de vidrio con la orina del paciente, olfateó el vapor e hizo a don Sabas un signo aprobatorio" (p.77). Como consecuencia de esta prueba para comprobar la existencia de cuerpos cetónicos en la orina, el mismo médico concluye: "Habrá que fusilarlo -dijo el médico dirigiéndose al coronel-. La diabetes es demasiado lenta para acabar con los ricos". «Ya usted ha hecho lo posible con sus malditas inyecciones de insulina». El mismo médico apostillaría después que "la pobreza es el mejor remedio contra la diabetes" (p.78). Es una descripción de la diabetes en adultos muy certera, causada, entre otras cosas por el exceso de comida y la vida sedentaria. El autor puede que rernos decir que la insulina, un producto muy innovador y norteamericano, no va a poder con una diabetes de un coronel caribeño. Como el coronel se ha portado "mal" y el azúcar no va a acabar con él, habrá que recurrir a algo tan familiar y castizo como es el pelotón de fusilamiento. Al final no olvidemos que en la autopsia de Santiago Nasar se encontró un hígado hipertrofiado por una hepatitis



mal curada, pero a la que el doctor Dionisio Iguarán más tarde apostilló: "Tenía que ser cura para ser tan bruto -me dijo-. No hubo manera de hacerle entender nunca que la gente del trópico tenemos el hígado más grande que los gallegos" (*Crónica...*, p.89).

4. CONCLUSIÓN

Con este trabajo se ha pretendido que un farmacéutico u otro profesional sanitario lea a García Márquez porque se trata de un escritor universal que incita de continuo a reflexiones con hechos insólitos, aventuras, enamoramientos, historia, etc. Si bien cuando de forma secundaria, se reconocen diversos aspectos farmacéuticos, se extrae un jugo particular, con independencia de que las alusiones a la farmacia y a las plantas medicinales sean ciertas o no. Los resultados nos demuestran que el autor escribe a menudo con mucha propiedad y de una forma muy elegante del tema aquí tratado. En una segunda lectura García Márquez nos relaciona la Farmacia con la sociedad de la época en un momento de solapamiento entre plantas medicinales y nuevos medicamentos de síntesis. También pensamos que estamos ofreciendo un recurso didáctico más para captar la atención docente a la hora de impartir distintas materias de la carrera, por lo que queda realizada una invitación a leer o releer estas novelas, sin perder nunca de vista que también se puede hacer con una mirada farmacéutica. De manera final, no hay que olvidar que este es un trabajo "abierto" sujeto a diferentes interpretaciones y enfoques, por lo que animamos a diferentes autores interesados a que sigan profundizando sobre el este asunto y aporten su propia visión y enfoque, que sin duda serán enriquecedores.

5. REFERENCIAS

1. González FJ. Descifrando la Botánica en Cien Años de Soledad y Amor en los Tiempos del Cólera. Ende: Sevilla. 2017. 92 pp.
2. García Márquez G. Vivir para contarla. Barcelona: Debolsillo 2012. 527pp.
3. Cómo sufrimos las flores. https://elpais.com/diario/1981/12/09/opinion/376700414_850215.html
4. Hudson A. Literature and medicine: Garcia Marquez. Love in the Time of Cholera. Lancet 1997; 350: 1169-72.
5. Sánchez F. La Medicina en la Obra Literaria de Gabriel García Márquez. <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/academedia/va-50/j-04ggm/>
6. Baños JE. El valor de la literatura en la formación de los estudiantes de medicina. Educ méd 2003; 6(2): 37-43.
7. Esteva de Sagrera J. La Farmacia en el Quijote. Farmacia y Sociedad 2005; 24:104-116.
8. Carpentier A. El Siglo de las luces. Barcelona: Industria Gráfica S.A (Bibliotex S. L.) 2001; p.318.
9. Vargas Llosa M. La ciudad y los perros. Barcelona: Seix-Barral (Biblioteca breve) 1963; 343 pp.
10. Vargas-Llosa M. La Guerra del fin del mundo. Barcelona: Seix-Barral 1984; p.432.
11. Vargas Llosa M. El suelo del celta. Madrid: Alfaguara 2010; 518 pp.
12. García Márquez G. Cien años de soledad. Madrid: Cátedra 1999; 559 pp.
13. García Márquez G. Amor en los tiempos del cólera. Barcelona: Debolsillo 1997; 495pp.
14. García Márquez G. El coronel no tiene quien le escriba. Barcelona: Debolsillo 1999; 99 pp.
15. García Márquez G. El Otoño del Patriarca. Barcelona: Debolsillo 1999; 329 pp..
16. García Márquez G. Crónica de una muerte anunciada. Barcelona: Debolsillo 1993, 329 pp.
17. García Márquez G. El general en su laberinto. Barcelona: Debolsillo 1998, 287 pp.
18. Libros más vendidos de Gabriel García Márquez. <https://www.dine-roenimagen.com/2014-04-17/35900> 16
19. Libros más leídos de Gabriel García Márquez. <https://www.actualidadliteratura.com/mejores-libros-gabriel-garcia-marquez/>
20. Opinión sobre El General en su laberinto. https://elpais.com/diario/1989/04/04/cultura/607644005_850215.html
21. Gabriel García Márquez: El oficio de escritor (Entrevista). Unesco Courier. 1996. <https://es.unesco.org/courier/febrero-1996/gabriel-garcia-marquez-oficio-escritor-entrevista>
22. Discurso de aceptación del premio Nobel de Literatura 1982. https://cvc.cervantes.es/actcult/garcia_marquez/audios/gm_nobel.htm
23. Pérez R. 2013. <http://legislacionfarmaceutica.blogspot.com/2008/05/historia-de-la-farmacia.html>.
24. Fernández de la Gala JV. Médicos y medicina en la obra de Gabriel García Márquez. Tesis Doctoral. Cádiz: Universidad de Cádiz 2016.
25. Padilla JC, Álvarez G, Montoya R, Chaparro P, Herrera S. Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106(1): 114-122.
26. Principales enfermedades en los siglos XVI-XVIII. Revista Academia Nacional de Medicina. <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/academedia/vam-128/enfermedades-xvi-xviii/>
27. Martínez AF, Hist M, Guatibonza SA. Cómo Colombia logró ser la primera potencia leprosa del mundo. Colomb Med 2005; 36(4): 244-253.



28. Sotomayor HA. Historia geopolítica de las enfermedades en Colombia. *Maguare* 1998; 13:73-84.
29. Serpa F. Historia del cólera en Colombia. *Biomédica* 1992. 12: 95-101.
30. Font P. Plantas medicinales: El Dioscórides renovado. Barcelona: Labor 1981. 1033 pp.
31. Paico. <http://revistablanca.com/farmacia/por-que-es-prohibido-el-quenopodio/>
32. La enfermedad de Gabriel García Márquez impacta en Colombia. <https://www.elcomercio.com/tendencias/cultura/enfermedad-de-gabriel-garcia-marquez.html>
33. Pandemia de la soledad. <https://www.nytimes.com/es/2020/06/24/espanol/opinion/covid-garcia-marquez-pestes.html>
34. La Peste del Insomnio. <https://www.intramed.net/contenido.asp?contenido=96257#:~:text=La%20peste%20del%20insomnio%2C%20dirigido,lectura%20de%20fragmentos%20de%20la>
35. Valdés B. Magallanes y la Ruta española de las especias. En: Primera circunnavegación del globo, Valdés ed. Málaga: Instituto de Academias de Andalucía 2019. pp. 89-120.
36. Charlton A. Medicinal uses of tobacco in history. *J R Soc Med* 2004; 97:292-296.
37. Camelo SM, Ardila A. Efectos de la escopolamina a corto y largo plazo en la memoria y las habilidades conceptuales. *Divers: Perspect Psicol* 2013; 9(2): 335-346.
38. Jaime JM. Licor arsenical de Fowler. Tomás Fowler (York, 1736-1801). *Epónimos científicos* 2010. 1-3.
39. Auwaerter PG, Dove P, Mackowiak PA. Simón Bolívar's Medical Labyrinth: An Infectious Diseases Conundrum. *Clin Infect Dis* 2011; 52 (1).
40. Medicamenta. Guía teórico-práctica para Farmacéuticos, Médicos y Veterinarios. Vol. I. Barcelona: Labor 1917. 1135p.
41. Jácome A. Historia de los medicamentos. Bogotá: Academia Nacional de Medicina; 2003. 350 pp.
42. Obregón A. Médicos, prostitución y enfermedades venéreas en Colombia (1886-1951). *Historia, Ciencias, Saúde- Manguinhos* 2002; 9: 161-186.
43. Raviña E. Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de los fármacos. 2 Vols.: Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela 2008.
44. Braña MF, del Río LA, Trives C, Salazar N. La verdadera historia de aspirina. *An R Acad Nac Farm* 2005; 71:813-819.
45. Villadiego M. Transformaciones de las narrativas publicitarias de la revista *Cromos*. En: I Congreso Iberoamericano de investigadores de la publicidad. Bogotá. 2016. p.379-389.
46. Godínez R. Los primeros medicamentos químicos en México (1917-1940). *Bol Soc Quim Mex* 2012; 6(1): 8-14.

Si desea citar nuestro artículo:

**Farmacia y plantas medicinales en la literatura:
caso de García Márquez**

Francisco José González Minero y Luis Bravo Díaz

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 171- 184

DOI: <http://>



Tabla 1. Plantas medicinales o derivados. Nombre común vs. Nombre científico.

Acónito	<i>Aconitum napellus</i> L.
Ajenjo mayor	<i>Artemisia absinthium</i> L.
Ají picante	<i>Capsicum annuum</i> L.
Ajos	<i>Allium sativum</i> L.
Alcanfor	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J.Presl
Amapola	<i>Papaver sp.</i> L.
Anís estrellado	<i>Illicium verum</i> Hook.f.
Almendra amarga	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb
Arnica	<i>Arnica montana</i> L.
Belladona	<i>Atropa belladonna</i> L.
Benjuí	<i>Styrax sp.</i> L.
Bija	<i>Bixa orellana</i>
Burundanga	<i>Datura stramonium</i> L.
Cacao	<i>Theobroma cacao</i> L.
Café	<i>Coffea arabica</i> L.
Cariaquito morado	<i>Lantana trifolia</i> L.
Chocolate	<i>Theobroma cacao</i> L.
Clavo de olor	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry
Coca	<i>Erythroxylum coca</i> Lam.
Cornezuelo del centeno (Hongo)	<i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul.
Enebro	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.
Epazote	<i>Dyphania chilensis</i> Mosyakin & Clemants
Estricnina	<i>Strychnos nux-vomica</i> L.
Goma arábica	<i>Acacia segenal</i> (L.) Willd.
Gordolobo	<i>Crescentia cujete</i> L.
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
Láudano	<i>Papaver somniferum</i> L.
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
Maranguango	<i>Cannabis sativa</i> L.
Mastuerzo	<i>Lepidium sativum</i> L.
Mostaza	<i>Brassica nigra</i> (L.) K. Koch
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.
Paico	<i>Dysphania ambrosioides</i> Mosyakin & Clemants
Pimienta de Cayena	<i>Capsicum annuum</i> L.
Quinina	<i>Cinchona sp.</i> L.
Ricino	<i>Ricinus communis</i> L.
Ruibarbo	<i>Rheum palmatum</i> L.
Sauce	<i>Salix sp.</i> (L.)
Sábila	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. F.
Sen	<i>Senna sp.</i> Mill
Sinapismos	<i>Brassica nigra</i> (L.) K. Koch
Tabaco	<i>Nicotiana sp.</i> L.
Tabonucos	<i>Dacryodes excelsa</i> Vahl
Té	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
Tilo	<i>Tilia sp.</i> L.
Trementina	<i>Pinus sp.</i>
Totumo	<i>Crescentia cujete</i> L.
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i> L.

CONSIDERACIONES SOBRE LA INNOVACIÓN INCREMENTAL EN MEDICAMENTOS

CONSIDERATIONS REGARDING INCREMENTAL DRUG INNOVATION

Emili Esteve Sala

Director del Departamento Técnico de Farmaindustria.

corresponding author: eesteve@farmaindustria.es

REVISIÓN

RESUMEN

El concepto de innovación incremental abarca las adaptaciones resultantes del análisis de la utilización de los medicamentos existentes, con el fin de incorporar una modificación o proponer un nuevo uso diseñado para beneficiar a los pacientes. Puede clasificarse en 6 distintas categorías, en función de la naturaleza o del objetivo de la innovación realizada.

La innovación incremental puede resultar muy interesantes para los profesionales sanitarios porque estas variaciones aportan mejoras en el tratamiento, en la continuación de los tratamientos, en la disminución de efectos adversos o en la adherencia.

La innovación incremental tiene también una excelente acogida desde la perspectiva del paciente, puesto que facilita el tratamiento y en muchos casos abre una expectativa terapéutica a determinados subgrupos, inexistente antes de la comercialización del medicamento.

Es interesante asimismo para el Sistema Nacional de Salud, ya que determinados pacientes tratados con innovaciones incrementales obtienen mejores resultados en salud y requieren con menor frecuencia hacer uso de otros servicios sanitarios.

Desde una perspectiva económica, muchas empresas farmacéuticas radicadas en nuestro país relevantes desde un punto de vista estratégico, podrían asimismo mejorar con este tipo de innovaciones el arsenal terapéutico aportando productos necesarios que, lamentablemente, no tienen en la actualidad las condiciones idóneas de viabilidad.

Por todo ello, la promulgación de una normativa española que ampare y aporte seguridad jurídica a los titulares de la autorización de comercialización de este tipo de innovaciones parece necesaria. Esta futura normativa debería incluir un procedimiento para calificar las innovaciones incrementales de interés para el Sistema Nacional de Salud y tener efectos económicos para garantizar su comercialización efectiva.

ABSTRACT

The concept of incremental innovation encompasses adaptations resulting from the analysis of the use of existing medicinal products, in order to incorporate a modification or propose a new use designed to benefit patients. It can be classified into 6 different categories, depending on the nature or objective of the innovation carried out.

Incremental innovation can be very interesting for health professionals because these variations provide improvements in treatment, in the continuation of treatments, in the reduction of adverse effects or in adherence.

Incremental innovation is also very well received from the patient's perspective, since it facilitates treatment and in many cases opens up a therapeutic expectation for certain subgroups that did not exist before the medicinal product was marketed.

It is also interesting for the National Health System, since certain patients treated with incremental innovations obtain better health results and require less frequent use of other health services.

From an economic perspective, many pharmaceutical companies established in our country and relevant from a strategic point of view, could also improve the therapeutic arsenal with this type of innovations by providing products of therapeutic interest that, unfortunately, do not currently have the ideal conditions for viability.

For all these reasons, the promulgation of a Spanish regulation that protects and provides legal certainty to the marketing authorization holders of this type of innovations seems necessary. This future regulation should include a procedure to qualify incremental innovations of interest to the National Health System and have economic effects to guarantee their effective commercialization.

Palabras Clave:

Innovación incremental
Reposicionamiento
Adherencia terapéutica
Comercialización efectiva
Precios de referencia

Keywords:

Incremental innovation
Repositioning
Therapeutic Adherence
Effective marketing
Reference prices

1. INTRODUCCIÓN

El tema que he escogido, la innovación incremental en medicamentos, creo que permite hacer un repaso a una materia que siempre está presente en esta Real Academia, la innovación en general y la referida a los medicamentos en particular y tiene, además, un notable interés para determinados laboratorios farmacéuticos, que ven en la innovación incremental una manera más de dar continuidad a la empresa mediante el desarrollo de nuevos medicamentos, en beneficio de los pacientes y del sistema sanitario.

La denominada innovación incremental parte del análisis de la utilización de los medicamentos buscando incorporar una modificación o un nuevo uso que beneficie directamente al paciente y al sistema sanitario. Su atractivo deriva directamente de la intencionalidad que tiene de modificar o adaptar un medicamento existente para ofrecer un tratamiento más apropiado bien a todos, bien a un subgrupo de pacientes.

Esto tiene un marcado interés para los profesionales sanitarios porque ven en estas variaciones una mejora en el tratamiento, en el seguimiento, en la disminución de reacciones adversas o en la adherencia, elementos que son de gran trascendencia en el día a día del trato con los pacientes.

La innovación incremental tiene también una excelente acogida desde la perspectiva del paciente, puesto que facilita el tratamiento y en muchos casos abre una expectativa terapéutica, inexistente antes de la comercialización del medicamento que comporta este tipo de innovación.

La innovación incremental también es interesante para el Sistema Nacional de Salud, sobre todo cuando los pacientes tratados con medicamentos que han incorporado mejoras incrementales obtienen mejores resultados de salud y requieren con menor frecuencia del sistema sanitario.

La innovación incremental también tiene su justificación económica. La industria farmacéutica, como cualquier otra industria en la actualidad, debe encontrar formas de reducir riesgos y garantizar retornos. Puesto que el sector farmacéutico tiene un riesgo muy elevado, algunos autores (1) consideran que es más aconsejable para la propia industria y los pacientes que un número grande de compañías sigan desarrollando mejoras continuas y constantes en medicamentos conocidos (Figura 1)

La paradoja se produce cuando estas bondades de la innovación incremental no son percibidas de igual modo por parte de las autoridades competentes encargadas del proceso de precio y financiación. Efectivamente, todo parece indicar que el pagador es mucho más proclive a reconocer la innovación radical que la incremental y es habitual que este tipo de mejoras las consideren insuficientes para obtener el beneficio de la financiación pública.

Además, algunas de estas novedades incrementales y centradas en la persona, aunque se lleguen a financiar, quedan posteriormente "atrapadas", si se me permite la expresión, en el Sistema de precios de referencia vigente en nuestro país, que no es lo suficientemente flexible para proteger determinadas presentaciones que comportan este tipo de innovación, naturalmente protegidas por patentes, y que resultan injustamente penalizadas con reducciones de precio que pueden llevar a la inviabilidad económica en su comercialización, a la salida de la financiación pública, a la retirada de la comercialización o a cercenar una futura solicitud de autorización y registro. La aplicación del Sistema de precios de referencia ha generado una abundante litigiosidad, especialmente en la interpretación de los criterios para la conformación de un conjunto (2).

La innovación incremental: beneficia a todos



Figura 1. Esquema de los beneficiados por la innovación incremental. Fuente: elaboración propia.

2. CLASIFICACIÓN DE LAS INNOVACIONES INCREMENTALES

La tipología de la innovación incremental no está inequívocamente establecida en la literatura científica. En el año 2019, a petición de la Federación Europea de Industrias y Asociaciones Farmacéuticas (EFPIA), una consultora especializada (IQVIA) realizó un informe estructurando la innovación incremental en seis categorías (3).

En dicho informe, a este tipo de innovación se la denomina innovación terapéutica centrada en las personas, puesto que una de las principales características de la innovación incremental no es otra que la voluntad que tienen las compañías farmacéuticas de tratar de ofrecer soluciones expresamente orientadas a la mejora del individuo, es decir, a reducir los efectos adversos de los medicamentos, mejorar la pauta de administración, favorecer la adherencia al tratamiento, facilitar la administración del medicamento, etc.

Las seis categorías de innovación incremental propuestas son las siguientes: i) los medicamentos que siguen al primero de la serie para una determinada categoría de la clasificación ATC, ii) las nuevas combinaciones a dosis fijas entre principios activos ya comercializados como medicamentos, iii) las reformulaciones de medicamentos para facilitar su administración a determinados colectivos de pacientes, iv) los reposicionamientos de medicamentos orientados a indicaciones distintas de las que tuvieran autorizadas, v) la inclusión de dispositivos de administración para facilitar la aplicación del medicamento, y vi) la incorporación de soluciones digitales a los dispositivos de los medicamentos para mejorar seguimiento y adherencia al tratamiento.

3. MEDICAMENTOS SEGUIDORES

Pueden definirse como medicamentos seguidores los que formulan principios activos químicos o biológicos estructuralmente similares y destinados al tratamiento de la misma indicación mediante un mecanismo de acción comparable a otros medicamentos ya comercializados.

Como es fácil colegir, esta definición abarcaría todo nuevo principio activo químico o biológico aparecido inmediatamente después del primero de la serie. En muchos casos el desarrollo de estos productos ha sido independiente y con posibilidades reales de haber sido los primeros de la serie, y se consideran en general nuevos medicamentos originales sin más, pues están avalados por un dossier de registro completo y gozan de una protección de patente comparable al primero de la serie.

Los medicamentos seguidores han sido algunas veces denostados. Se ha argumentado que no suponen una aportación relevante en terapéutica, pero en la mayoría de los casos esto no ocurre. El primero de la serie puede, o no, ser el mejor y nos conviene tener abundantes medicamentos en la serie, tanto porque alguno se puede tener que retirar del mercado o puede ser superado, como frecuentemente suele ocurrir, por investigaciones posteriores. Si revisamos el tratamiento del virus de la hepatitis C en la última década, los primeros medicamentos que se comercializaron formulaban como principio activo telaprevir y boceprevir. Se aprobaron en España hace ahora una década, en 2011. Pues bien, actualmente ninguno de estos dos principios aparece en un medicamento comercializado en nuestro país (4), puesto que han sido ampliamente desplazados por sus seguidores, demostrando la importancia que tiene seguir investigando.

Tipología de la innovación incremental

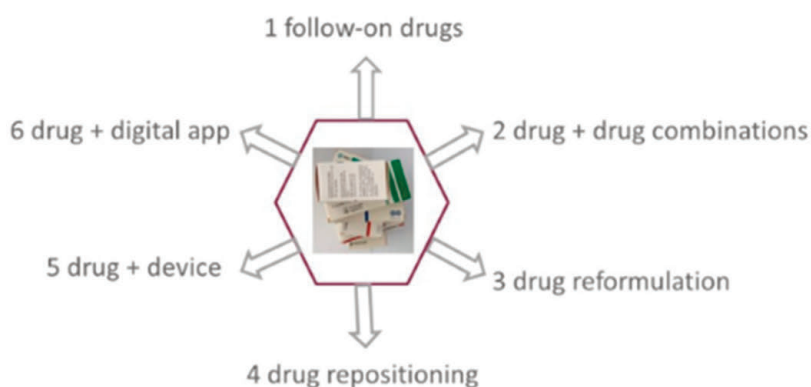


Figura 2: Tipología de la innovación incremental según informe IQVIA (1). Fuente: elaboración propia a partir del citado informe.



Tal vez la categoría que más requiere de la protección normativa de entre los medicamentos de innovación incremental seguidores sería la que engloba a aquellos medicamentos formulados con variaciones moleculares que conduzcan a diferentes sales, ésteres, éteres, isómeros, mezclas de isómeros, complejos o derivados de una sustancia activa que reivindiquen propiedades diferentes en cuanto a eficacia y/o seguridad. Es una diferenciación legal recogida en el artículo 10.2 b) de la DIRECTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano (5) que permite que el principio activo se considere diferente siempre que el medicamento que lo formula tenga propiedades considerablemente diferentes en cuanto a seguridad y/o eficacia.

Para muchas compañías farmacéuticas este grupo de medicamentos seguidores constituye una verdadera oportunidad, especialmente cuando su aparición se produce como consecuencia de variaciones químicas o biotecnológicas sobre principios activos ya comercializados y fuera de patente. Se trata del desarrollo que pueden iniciar las pequeñas y medianas empresas. En el caso de algunas de ellas puede ser la única oportunidad para lanzar un nuevo medicamento, puesto que la inversión necesaria en este tipo de solicitudes de registro suele ser notablemente inferior con respecto a las innovaciones radicales.

4. NUEVAS COMBINACIONES

La segunda categoría de medicamentos que comportan una innovación incremental es la que conforman las asociaciones de dos medicamentos previamente autorizados. Debemos excluir de este grupo los casos en los que la combinación contiene un principio activo nuevo, que no ha formado parte de ningún medicamento con anterioridad. En este caso no podemos hablar de una innovación incremental, sino de un nuevo medicamento.

Dentro de la categoría de las combinaciones, la asociación de dos medicamentos A + B tiene también una diferente consideración legal a efectos de protección de registro en función de si la pretensión de la asociación es la mera sustitución o si se pretende una mejora (6).

Tenemos ejemplos de asociaciones a dosis fijas de principios activos en prácticamente todas las áreas de la terapéutica, pero una de las más conocidas han sido las denominadas "polipíldoras", que se han autorizado combinando principios activos conocidos con objeto de aumentar la adherencia los tratamientos y así proteger mejor a los pacientes.

Existe una buena base científica para apoyar las solicitudes basadas en combinaciones a dosis fijas y por ello las agencias reguladoras otorgan las correspondientes autorizaciones de comercialización a este tipo de combinaciones (7).

5. REFORMULACIONES

La tercera categoría se refiere a la reformulación de medicamentos previamente autorizados y comercializados. Puede clasificarse, a su vez, en dos grupos principales.

El primer grupo de reformulaciones respondería a lo que en el ámbito reglamentario se denominan extensiones de línea, que comportan nuevos desarrollos del medicamento original mediante formas farmacéuticas para ampliar la gama de uso de una determinada marca. Estas extensiones de línea tienen solicitudes basadas en la documentación inicialmente presentada por el titular de autorización de comercialización que se completan, naturalmente, con la documentación pertinente a dicha forma farmacéutica. Formalmente, se trata de una innovación incremental, puesto que amplía las posibilidades de tratamiento del medicamento, pero esta innovación es la que realmente se espera como continuación de la innovación principal y es la que habitualmente realiza el titular de la autorización de comercialización del medicamento innovador.

El segundo grupo de reformulaciones suele aparecer cuando, como consecuencia de necesidades que afloran en el tratamiento habitual, el mismo titular de la autorización de comercialización de un medicamento u otra compañía farmacéutica desarrollan una innovación incremental por cuenta propia o a sugerencia de los profesionales sanitarios (médicos, farmacéuticos, enfermeras, del personal al cuidado de los pacientes, de las asociaciones o incluso de los pacientes a título individual) porque se hubiera detectado la conveniencia de disponer de una determinada forma farmacéutica nueva para facilitar la administración del medicamento, reducir la aparición de efectos adversos, mejorar la eficacia o ayudar a mejorar el seguimiento del tratamiento.

La reformulación puede estar orientada a disminuir la dosis manteniendo los efectos, como ocurre con determinadas formulaciones de itraconazol oral, que nunca deberían prescribirse por principio activo, sino por marca, porque actualmente las cápsulas de 50 mg de una determinada marca son comparables a las cápsulas de 100 mg de las restantes presentaciones.

La innovación incremental también puede estar pensada específicamente en las preferencias de los pacientes. Un ejemplo expuesto en diciembre del año 2019 en la Real Academia de Medicina de Cataluña puede ilustrar esta cuestión. Los pacientes afectados de psoriasis pueden ser tratados inicialmente con un análogo sintético de la vitamina D3 asociado a un corticosteroide. Hace más de 20 años una compañía inició la comercialización de uno de estos preparados tópicos en forma de pomada. Naturalmente, esta forma farmacéutica no es la ideal para administrar un medicamento tópico y por ello la compañía obtuvo la autorización posterior para comercializar un gel con el mismo contenido en principios activos. En



ambas circunstancias los pacientes tenían que esperar bastantes minutos después de la administración del medicamento para vestirse, y fueron los propios pacientes quienes expusieron este inconveniente. La compañía desarrolló entonces una forma tópica en aerosol que permite cubrir la zona de administración a los pocos minutos, de manera que la autonomía del paciente se ha incrementado.

Lo deseable sería que las formulaciones incrementales pudieran ser efectivamente consideradas y reconocidas por las autoridades competentes en materia de precio y financiación con carácter diferencial, puesto que suponen un avance documentado satisfactoriamente mediante estudios clínicos y ratificado por el otorgamiento de la preceptiva autorización de comercialización del medicamento.

6. REPOSICIONAMIENTO

El reposicionamiento de medicamentos es otra de las facetas que caracterizan la innovación incremental. Consiste en aprovechar los conocimientos que se tienen sobre un determinado medicamento químico o biológico ya comercializado y proponer su uso para una indicación sustancialmente diferente respecto a la que tiene autorizada.

Para ello, lógicamente, se requiere una compañía farmacéutica solicitante de la autorización de comercialización que aporte la documentación de registro sustanciando la nueva indicación.

En el caso del reposicionamiento de medicamentos, pueden distinguirse, al menos, dos grandes categorías.

La primera, cuando el uso de un medicamento en otra indicación distinta a la que tiene autorizada constituye una práctica habitual, de manera que el medicamento se viene empleando en clínica, aunque la ficha técnica autorizada no contemple la indicación. Esta situación no es la deseable y preocupa a las autoridades competentes que buscan una regularización, de oficio (8).

La segunda categoría de reposicionamientos no se produciría, si se me permite la expresión, de oficio —como el caso anterior—, sino a petición de parte, es decir, cuando una compañía farmacéutica solicitante hiciera un desarrollo expreso.

En España tenemos algunos casos de éxito de reposicionamiento.

Como es sabido, nifedipino es un calcioantagonista del grupo de las dihidropiridinas que inhibe el flujo de iones calcio al tejido miocárdico y al tejido muscular liso. El nifedipino dilata las arterias coronarias mejorando el suministro de oxígeno al miocardio al aumentar el flujo sanguíneo coronario. Las cápsulas blandas de

10 mg de nifedipino tienen actualmente autorizadas tres indicaciones en el ámbito cardíaco: angina de pecho crónica estable (angina de esfuerzo); angina de pecho vasoespástica (angina de Prinzmetal, angina variante) y síndrome de Raynaud (4). Dado que nifedipino también inhibe el flujo de iones calcio en los canales lentos del tejido muscular liso de las paredes uterinas, se ha venido utilizando, fuera de indicación, en el tratamiento de la amenaza de parto prematuro, debido precisamente a su actividad farmacológica, que le otorga una acentuada acción relajante del miometrio.

El reposicionamiento de nifedipino ha exigido a la compañía farmacéutica que lo ha solicitado la elaboración de un dossier de registro con la correspondiente documentación sobre calidad, seguridad y eficacia, incluidos los pertinentes estudios, que ha permitido a la AEMPS otorgar la correspondiente autorización de comercialización en retrasar el parto prematuro inminente en mujeres embarazadas que presenten: - contracciones uterinas regulares de al menos 30 segundos de duración y con una frecuencia de 4 o más contracciones cada 30 minutos. - dilatación de cuello uterino de 1 a 3 cm. (0 a 3 cm para mujeres nulíparas) y borrado del cuello uterino en más del 50%.- edad de al menos 18 años,- edad gestacional de 24 a 33 semanas completas y - frecuencia cardíaca fetal normal.

De esta manera, ya no es necesario que en la farmacia del hospital extraigan el contenido de las cápsulas blandas de nifedipino 10 mg para elaborar una preparación, con todas las limitaciones técnicas y legales que supone esta manipulación.

La innovación incremental ha permitido disponer de una presentación comercial de un medicamento que, aunque tenía todo el racional farmacológico, no disponía de una presentación comercializada en nuestro país.

7. INCLUSIÓN DE DISPOSITIVOS DE ADMINISTRACIÓN

Los dispositivos para facilitar la administración se conocen desde antaño y son muchos los adminículos que acompañan a los medicamentos para aplicarlos en una zona óptima o para lograr que el tamaño de partícula sea el adecuado o para distribuir uniformemente el medicamento en una superficie determinada. Pero la aplicación de una tecnología cada vez más sofisticada está transformando la administración de algunos medicamentos.

Un caso reconocido fue la aparición de las denominadas plumas de insulina a mediados de los años 80. En aquel momento, los pacientes diabéticos disponían de viales comercializados de insulinas en sus diferentes formulaciones, pero debían adquirir en las farmacias, por separado, las jeringuillas. Para ese colectivo de pacientes, la aparición de las plumas supuso una diferencia sustancial

y, aunque los viales de insulina todavía se comercializan (1,3%), la proporción de plumas en el mercado de farmacia ya supera el 98% de las presentaciones comercializadas.

Del mismo modo, podemos hablar de las plumas de metotrexato, que superan a las jeringas precargadas especialmente en el caso de pacientes con dificultades de manipulación. Igualmente, en el caso de las plumas de apomorfina. Para los pacientes con Parkinson, con dificultades de manipulación asociadas a la enfermedad, las plumas fueron determinantes.

La tecnología aplicada a la administración de medicamentos, pensada para las personas, desde luego contribuye a hacer los tratamientos más cómodos y seguros, incluidos los que, por su naturaleza inyectable, suponen un reto. Existen numerosos ejemplos de ello y Farmaindustria está trabajando en trasladarlos a la sociedad (9).

Pero no sólo los inyectables, los inhaladores también son todo un reto, y una mejora clara para el mejor control de ciertas enfermedades pulmonares.

En algunos de estos medicamentos, la innovación incremental es doble, porque incorporan un dispositivo de administración y combinan varios principios activos.

Este es el caso de las combinaciones de inhaladores empleadas en EPOC que reúnen en un mismo medicamento dos o tres principios activos en el dispositivo de inhalación. De esta forma, el paciente, manejando un único dispositivo, puede administrarse la

medicación que antes requería el manejo de dos o hasta tres dispositivos distintos, en función del tratamiento, resultándole mucho más fácil seguirlo (10).

Los datos demuestran que este tipo de estrategias benefician no sólo al paciente, sino que también pueden hacerlo respecto al propio sistema sanitario, puesto que los pacientes tratados con este tipo de combinaciones reducen la frecuencia con la que acuden a Urgencias por crisis asmáticas (11).

8. INCORPORACIÓN DE SOLUCIONES DIGITALES A LOS DISPOSITIVOS

Esta sexta y última categoría de medicamentos que aportan una innovación incremental hace referencia a la combinación de un medicamento que ya se encuentra en el mercado y un dispositivo digital orientado específicamente para mejorar la administración, monitorizar el cumplimiento por parte del paciente, comprobar el nivel de adherencia, etc.

Este tipo de innovación no debe entenderse como el futuro, sino como el presente, puesto que existen abundantes aplicaciones que permiten interconectar al paciente con el profesional sanitario y de esta manera minimizar los problemas relacionados con los medicamentos.

Uno de los ejemplos que se ha descrito para ilustrar esta categoría hace referencia a la combinación de levodopa y carbidopa

Principales acciones para afianzar la innovación incremental

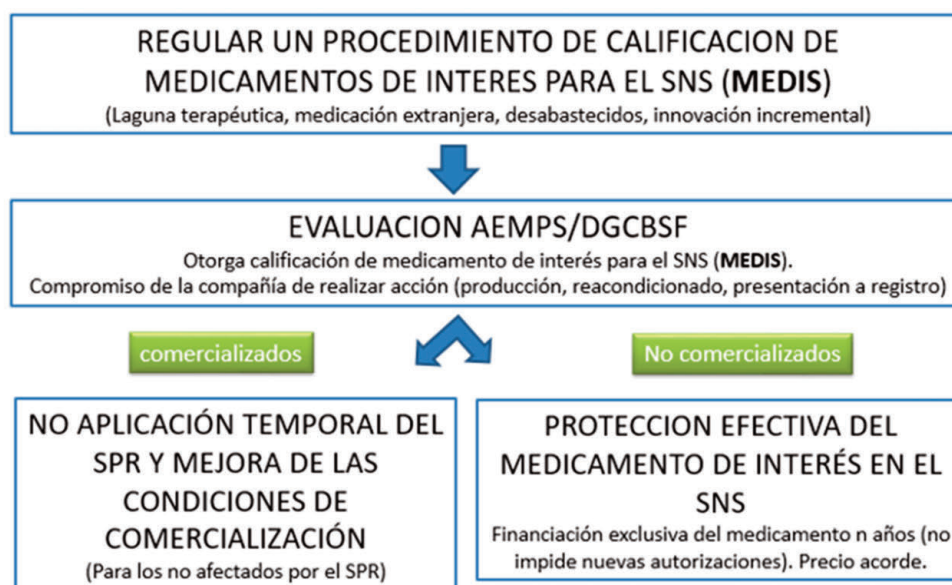


Figura 3. Principales acciones para afianzar la innovación incremental. Fuente: Elaboración propia

en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. El medicamento en cuestión dosifica pequeños comprimidos (que permiten ajustar adecuadamente la dosis) mediante un dispositivo dosificador que avisa al paciente del momento de las diferentes tomas.

El paciente, simplemente pulsando un botón, vierte en un vaso de agua la dosis apropiada.

El valor que aporta esta innovación radica en la mejora en la adherencia, puesto que el dispositivo se programa para avisar de los momentos de administración, disminuye la aparición de efectos adversos puesto que la dosificación resulta más precisa y, por último, las funciones del dispositivo permiten que el paciente informe al médico, de manera que el profesional puede seguir con más facilidad la evolución de la enfermedad. Por otra parte, la experiencia del paciente se describe como muy positiva.

Inicialmente, la decisión de los pagadores en Suecia, que es el primer país donde se ha presentado esta innovación, fue no reembolsar el medicamento con el dispositivo citado. Sin embargo, desde mayo de 2016 ya lo está reembolsando, aunque con restricciones: sólo en pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada para los que la terapia convencional no es apropiada para el control de las fluctuaciones motoras (3).

Este tipo de aproximaciones digitales aumentará en los próximos años y es posible que resulten de uso cotidiano, por lo que es fundamental que los requisitos de los pagadores sean públicos, detallados y gocen de amplio consenso.

9. NECESIDAD DE AFIANZAR LA INNOVACIÓN INCREMENTAL EN ESPAÑA

Se requieren diversas acciones para afianzar la innovación incremental puesto que la innovación es connatural a la industria farmacéutica y, por tanto, las compañías seguirán invirtiendo tanto en el descubrimiento de nuevos medicamentos como en el desarrollo de los existentes. De esta manera, siempre dispondremos de mejoras incrementales como resultado de esta dinámica investigadora propia del sector farmacéutico.

No obstante, determinadas innovaciones pueden tener su viabilidad en juego porque no estén suficientemente valoradas por las autoridades competentes.

En estas circunstancias, si las innovaciones están comercializadas y no son adecuadamente recompensadas tenderán a desaparecer del mercado. Y si las innovaciones están pendientes de desarrollo no verán la luz, puesto que, de hacerlo, no obtendrían suficiente recompensa.

Parece necesario, por lo tanto, establecer un sistema que permita calificar de interés para el Sistema Nacional de Salud aquellas innovaciones incrementales que se consideren adecuadas para los pacientes del sistema público.

Un sistema de calificación de innovación incremental de interés para el sistema público no sería una solución imposible de adoptar en el ámbito de los medicamentos. Existen antecedentes de calificación que han sido adoptados tanto a nivel nacional como comunitario para identificar, por sus características, grupos singulares de medicamentos.

Uno de los ejemplos que permiten ilustrar conceptualmente la calificación de la innovación incremental lo tenemos en el caso de los medicamentos huérfanos: mediante la intervención del Comité de Medicamentos Huérfanos creado en el seno de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), las solicitudes presentadas obtienen una calificación (en este caso la de medicamento huérfano) que tiene una serie de consecuencias directas, por ejemplo, en el ámbito de la futura tramitación y registro y en los incentivos de exclusividad comercial, entre otros (12).

Cuando la Administración sanitaria quisiera fomentar la aparición de una determinada presentación de un medicamento conocido, que considerase conveniente para el sistema, debería ser posible que las solicitudes que se hicieran ajustadas a esta necesidad se beneficiaran de un marchamo de innovación incremental de interés para el sistema público que se tradujera, en definitiva, en un medicamento de interés para el SNS, de manera que, una vez obtenida la autorización, quedara exenta de la penalización que, por el hecho de formular un principio activo previamente autorizado, estaría condenada a tener entrando en el sistema de precios de referencia.

Esta exclusión, para proteger un medicamento del sistema de precios de referencia, se acaba de producir en España, aunque con limitaciones, demostrando, efectivamente, el sentido que tiene el artículo 3 del Real Decreto Legislativo 1/2015 (13).

Naturalmente, debería preverse este tipo de exclusiones para otros casos concretos para lo cual se necesitaría, en primer lugar, disponer de una regulación que permitiera calificar a los medicamentos de interés para el SNS, y en segundo, un procedimiento para dicha calificación basada en unos criterios objetivos y publicados para que las compañías pudieran emprender nuevos desarrollos siguiendo estas pautas y pudieran presentar las solicitudes con la documentación apropiada. Para la calificación de la innovación incremental de interés para el sistema debería conformarse una comisión integrada por la AEMPS, la Dirección General de Cartera Básica de Servicios para el Sistema Nacional de Salud y Farmacia y representantes de profesionales sanitarios, de pacientes e industria.

En el caso de presentaciones sin competencia, y por tanto no afectadas por el sistema de precios de referencia, la calificación de interés debería tenerse en cuenta favorablemente en los procedimientos de revisión al alza de este tipo de medicamentos.

Las consecuencias de obtener una calificación de interés para el sistema serían, en el caso de que las presentaciones estu-



vieran integradas en el sistema de precios de referencia, la exención de la aplicación del sistema mientras perdurara la condición de interés.

En el caso de presentaciones sin competencia, y por tanto no afectadas por el sistema de precios de referencia, la calificación de interés debería tenerse en cuenta favorablemente en los procedimientos de revisión al alza de este tipo de medicamentos.

Se trataría, en definitiva, de que en los casos en los que existiera una confluencia entre los intereses del sistema sanitario y los desarrollos de las compañías farmacéuticas se lograra alcanzar una fórmula que protegiera este tipo de presentaciones que comportan una innovación incremental de interés para el SNS.

La protección de estas presentaciones no sólo debería abarcar la innovación incremental de interés para el sistema sanitario, sino también a determinados formatos de medicamentos comercializados que están en franco riesgo de desabastecimiento debido al escaso volumen de comercialización y de precio (14).

10. CONCLUSIONES

En definitiva, las conclusiones que se proponen son dos:

La primera: Se requiere una normativa que ampare y aporte seguridad jurídica a las iniciativas que se cursen para proteger mediante una calificación aquellas innovaciones incrementales que el sistema sanitario requiere.

La segunda: La innovación incremental es el tipo de mejora que pueden realizar muchas compañías farmacéuticas y especialmente las pequeñas y medianas que tienen mucho más difícil acceso a las inversiones que comporta la innovación radical. Muchas empresas farmacéuticas radicadas en nuestro país y estratégicamente muy importantes porque ofrecen empleo de calidad y producen un bien esencial, el medicamento, podrían mejorar con sus aportaciones el arsenal terapéutico y retendrían productos muy necesarios que, lamentablemente, no tienen en la actualidad las condiciones idóneas de viabilidad.

11. REFERENCIAS

1. Wertheimer A, Santella T, Pharmaceutical Evolution The Advantages of Incremental Innovation in Drug Development. Competitive Enterprise Institute 2009. Washington, DC [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://cei.org/sites/default/files/Wertheimer%20and%20Santella%20-%20Pharmaceutical%20Evolution.pdf>
2. Sentencia del Tribunal Supremo. Roj: STS 2955/2017. Sala de lo Contencioso. Madrid. Sección: 4. Fecha: 11/07/2017. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: [http://www.poderjudicial.es/se-](http://www.poderjudicial.es/se-arch/contenidos.action?action=contentpdf&database=match=TS&reference=8106554&links=octocog&optimize=20170724&publicinterface=true)
3. Nijhuis T, Guan Q, Tewary V. White Paper Assessing Person-Centered Therapeutic Innovations. IQVIA 2019. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: https://www.efpia.eu/media/413282/assessing-person-centered-therapeutic-innovations-wpa4_web.pdf
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. AEMPS. Centro de información online de medicamentos. CIMA. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/cima/publica/home.html>
5. Unión Europea. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. DO L 311 de 28.11.2001. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_es.pdf
6. Comisión Europea. Notice to applicants volume 2A Procedures for marketing authorisation. Chapter 1 marketing authorisation. Revisión de julio de 2019. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-2/vol2a_chap1_en.pdf
7. Castellano JM, Verdejo J, Ocampo S. et al. Clinical Effectiveness of the Cardiovascular Polypill in a Real-Life Setting in Patients with Cardiovascular Risk: The SORS Study. Archives of Medical Research. 2019; 50(1):31-40.
8. STAMP (Working group of the Safe and Timely Access to Medicines for Patients) Revisión de junio de 2019. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/committee/pharm773_repurposing_annex_en.pdf
9. FARMAINDUSTRIA. Innovación para las personas. Innovación incremental. [Última consulta: 08.03.2020]. Disponible en: <https://www.farmaindustria.es/web/prensa/notas-de-prensa/2019/12/12/farmaindustria-trabaja-en-un-plan-para-fomentar-la-innovacion-incremental-de-los-medicamentos/>
10. Van der Palen J, Moeskops-van Beurden W, Dawson CM, et al. A randomized, open-label, single-visit, crossover study simulating triple-drug delivery with Ellipta compared with dual inhaler combinations in patients with COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2018; 13: 2515–2523. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6110160/>
11. Sicras A, Huerta A, Navarro R et al. Economic impact of delaying initiation with multiple-inhaler maintenance triple therapy in Spa-



- nish patients with chronic obstructive pulmonary disease. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2019;14:2121–2129. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://www.dovepress.com/economic-impact-of-delaying-initiation-with-multiple-inhaler-maintenan-peer-reviewed-article-COPD>
12. Unión Europea. Reglamento (CE) N° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 1999 sobre medicamentos huérfanos. DO L 18 de 22.01.2000 [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000R0141-20190726&from=ES>
 13. España. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE núm. 177, de 25 de julio de 2015. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2015/BOE-A-2015-8343-consolidado.pdf>
 14. Esteve Sala E, Montes Barroso F, Bel Prieto E, et al. Cross-sectional study on medicinal products without commercial interest (MPWCI) in the Spanish market. BMJ Open 2019;9:e023054. doi:10.1136/bmjopen-2018-023054. [Última consulta: 28.03.2021]. Disponible en: <https://bmjopen.bmj.com/content/9/1/e023054>

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras son para agradecer a los miembros de la Real Academia Nacional de Farmacia mi elección como académico correspondiente de esta insigne institución. En particular, a la Doctora Rosa Basante, al Doctor Ángel María Villar del Fresno y al Doctor Antonio Doadrio, que impulsó mi candidatura, me ha presentado con mucha más brillantez de la que merezco y con el que he mantenido, desde el primer momento, un absoluto entendimiento, haciendo posible la lectura de este discurso.

No puedo dejar de tener un sentido recuerdo y un profundo agradecimiento a algunas personas que ya no están con nosotros pero que fueron un referente para mí en el pasado. En el plano personal, a mis padres, que esforzaron para que mis hermanos y yo tuviéramos las herramientas necesarias para desenvolvernos en la vida con honradez. En el plano profesional, al Dr. Eduardo Albors que me propuso para académico correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña y al Dr. Francesc Taxonera que me animó en todo momento a dar ese paso; También al Dr. Juan Manuel Reol de Tejada, que me escribió un ilegible tarjetón nada más ingresar en el Cuerpo de Farmacéuticos de la Sanidad Nacional, creo que dándome la enhorabuena, y que me ganó para siempre

entre sus admiradores desde ese momento y finalmente, con todo mi dolor, a mi querida amiga Regina Múzquiz, compañera de oposición, que nos dejó no hace todavía un año, y a la que las circunstancias excepcionales que nos está tocando vivir, le están retrasando el homenaje que bien se merece.

Aprovecho esta tribuna también para hacer llegar mi más afectuoso agradecimiento a mis compañeros de trabajo en Farmindustria, y a los compañeros de las compañías farmacéuticas, miembros de nuestros grupos de trabajo. Desde luego, mi presencia aquí se debe en gran parte a ellos: decenas, centenares, de reuniones con los mejores expertos de la industria farmacéutica facilitan, como si de un proceso de ósmosis se tratara, el aprendizaje constante y la actualización, imprescindibles en nuestro sector.

Quiero asimismo trasladar mi agradecimiento a mis antiguos compañeros de la Administración sanitaria: de la AEMPS, de la DG de Farmacia, de la EMA, de las CCAA. Mis quince años como funcionario del Cuerpo Farmacéutico de la Sanidad Nacional, me hacen deudor hacia muchas personas que contribuyeron a que tuviera cierto conocimiento de la legislación farmacéutica y suficiente grado de comprensión sobre el funcionamiento de la Administración pública. A ellos, mi especial gratitud.

Tampoco quiero olvidarme de mis colegas profesionales del CGCOF, AESEG, ANEFP, AEFI, BIOSIM, FEDIFAR, FENIN, SEVeM, SIGRE. De ellos he aprendido que cualquier cosa puede apreciarse de forma diferente según el ángulo desde la que se considere.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos de la carrera dispersos por nuestro país y por el extranjero, y mis amigos “no de la carrera” algunos de los cuales han decidido estar presentes, por la indescriptible paciencia que han mostrado conmigo.

Naturalmente, quiero terminar el capítulo de agradecimientos dejando para el final lo que, sin duda, es lo más importante para mí: toda mi familia. En especial a mi mujer, Belén y a mis hijos, Jaime, Nacho y Belén. A todos ellos debo, con la más absoluta certeza, que el trazado del camino recorrido sea el que me haya conducido hoy hasta aquí.

Si desea citar nuestro artículo:

Consideraciones sobre la innovación incremental en medicamentos

Emili Esteve Sala

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. N° 2 (2021) · pp. 185- 194

DOI: <http://>

ALIMENTACIÓN SALUDABLE Y SOSTENIBLE EN TIEMPOS DE LA PANDEMIA COVID-19

HEALTHY AND SUSTAINABLE FOOD HABITS IN TIMES OF THE COVID-19 PANDEMIC

Montaña Cámara Hurtado

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

corresponding author: mcamara@ucm.es

REVISIÓN

RESUMEN

El primer reto al que nos enfrentamos en este siglo XXI es el de poder alimentar a todos los habitantes de este planeta con alimentos seguros y saludables y además de forma sostenible. Existen sociedades donde el principal problema es la disponibilidad de alimentos, lo cual deriva en malnutrición y enfermedades de la pobreza (principalmente transmisibles) junto a otras donde la disponibilidad de alimentos no es el problema, pero paradójicamente se dan casos de malnutrición por malas elecciones dietéticas que derivan en las denominadas enfermedades de la riqueza (no transmisibles), como es el caso de las enfermedades cardiovasculares como principal causa de mortalidad. La irrupción a principios del año 2020 de la emergencia provocada por el coronavirus SARS-Cov2 ha hecho de esta situación un nuevo reto en todo el mundo, sin distinción de países con ingresos altos o bajos. Este discurso pretende abordar la importancia de mantener un adecuado estatus nutricional para mantener un buen estado de salud, minimizar los efectos negativos provocados por la COVID-19 así como facilitar la recuperación de los pacientes. Se revisará la evidencia científica relativa al papel de los micronutrientes y compuestos bioactivos en el fortalecimiento del sistema inmune, un efecto beneficioso sinérgico basado en sus mecanismos de acción complementarios. Se tratará además el nuevo concepto de "dieta de salud planetaria" que considera la relevancia de las elecciones dietéticas, por su implicación tanto para la salud humana como para el medio ambiente, manteniendo los recursos disponibles: agua tierra y suelo. El objetivo final es profundizar en el conocimiento científico de manera que pueda ser de utilidad para la sociedad; la promoción de la seguridad alimentaria, mediante una alimentación saludable y sostenible.

ABSTRACT

The first challenge we face in this 21st century is to be able to feed all the inhabitants of this planet with safe and healthy food in a sustainable way. There are societies where the main problem is the availability of food, which leads to malnutrition and diseases of poverty (mainly communicable). In other societies, the availability of food is not the problem, but paradoxically there are cases of malnutrition due to poor dietary choices, which lead to the so-called wealth diseases (non-communicable), such as cardiovascular diseases as the main cause of mortality. The emergence at the beginning of 2020 of the emergency caused by the SARS-Cov2 coronavirus has made this situation a new challenge throughout the world, without distinction of countries with high or low income. The speech aims to address the importance of maintaining an adequate nutritional status to maintain good health, minimize the negative effects caused by COVID-19 as well as facilitate the recovery of patients. Scientific evidence regarding the role of micronutrients and bioactive compounds in strengthening the immune system will be reviewed, a synergistic beneficial effect based on their complementary mechanisms of action. It will also discuss the new concept of "planetary health diet" that considers the relevance of dietary choices, due to their implication for both human health and the environment, while maintaining available resources: water, land and soil. The ultimate goal is to deepen scientific knowledge so that it can be of use to society; promoting food security through healthy and sustainable eating.

Palabras Clave:

Alimentación saludable
Antioxidantes
Sistema inmune
Micronutrientes
Alimentación sostenible

Keywords:

Healthy food
Antioxidants
Immune system
Micronutrients
Sustainable food systems



1. INTRODUCCIÓN

El primer reto al que al que nos enfrentamos en este siglo XXI es el de poder alimentar a todos los habitantes de este planeta con alimentos seguros y saludables de forma sostenible. Varios informes internacionales nos han hecho reflexionar sobre las consecuencias que tienen, el modo de producir alimentos, así como nuestras elecciones dietéticas, tanto para nuestra salud individual como para el medio ambiente donde habitamos (1,2). La carga de la malnutrición en todas sus formas sigue constituyendo un desafío y es probable que la seguridad alimentaria y el estado nutricional de los grupos de población más vulnerables se deterioren aún más debido a las repercusiones socioeconómicas y sanitarias de la pandemia COVID-19.

En la actualidad coexisten dos realidades en cuanto a la alimentación: las dos caras de la Seguridad Alimentaria (Food Safety vs Food Security). Existen sociedades donde el principal problema es la disponibilidad de alimentos, lo cual deriva en malnutrición y enfermedades de la pobreza (principalmente transmisibles) junto a otras donde la disponibilidad de alimentos no es el problema, pero paradójicamente se dan casos de malnutrición por malas elecciones dietéticas que derivan en las denominadas enfermedades de la riqueza, generalmente enfermedades no transmisibles (3). Entre ellas, las cardiopatías son desde hace 20 años la causa principal de mortalidad en todo el mundo, si bien en la actualidad provocan más muertes que nunca. Por otro lado, las enfermedades infecciosas han constituido una de las principales causas de muerte para la especie humana desde sus orígenes. En 2019, la neumonía y otras infecciones de las vías respiratorias inferiores fueron el grupo más mortífero de enfermedades transmisibles siendo la causa principal de muerte en países de ingresos bajos (4).

La irrupción a principios del año 2020 de la emergencia provocada por el coronavirus SARS-Cov2 causante de la pandemia COVID-19 ha hecho de esta situación un auténtico reto siglo del XXI en todo el mundo, sin distinción de países con ingresos altos o bajos.

En la lucha contra las enfermedades causadas por virus la medida más eficaz para su control es el desarrollo de vacunas que cumpla con las garantías de calidad, seguridad y eficacia (5). En este sentido, la base de datos de seguimiento y panorama de vacunas candidatas COVID-19, de la OMS, compila información detallada y actualizada sobre las vacunas candidatas COVID-19 en desarrollo (6).

La enfermedad COVID-19, está caracterizada por provocar un síndrome respiratorio agudo grave, que cursa con sintomatología algo diferente en función del grupo de población afectada, y se ob-

serva que aquellos con su sistema inmunitario comprometido, pueden correr un riesgo más elevado de sufrir complicaciones graves, de forma similar a lo que se observa con otras enfermedades respiratorias. Pero no debemos olvidar otros factores de riesgo que condicionan la severidad de la enfermedad, como es el estatus nutricional.

2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DIETÉTICOS EN LA CARGA GLOBAL DE ENFERMEDAD

La dieta subóptima es un importante factor de riesgo prevenible de las enfermedades no transmisibles (ENT). Este hecho ha sido confirmado por los resultados del estudio Global Burden of Disease Study 2019 (7) tras evaluar el consumo de los principales alimentos y aporte de nutrientes en 195 países y cuantificar el impacto de su ingesta subóptima en la mortalidad y morbilidad de las ENT. Los factores dietéticos más críticos son la ingesta de granos enteros, frutas, hortalizas, semillas y legumbres entre otros por su contenido en fibra. Estos datos acaban de ser corroborados por el estudio de la American Heart Association (8) que establece que el consumo de productos vegetales "Ayuda a reducir el riesgo de padecer numerosas enfermedades crónicas que son las principales causas de muerte, como las cardiovasculares o el cáncer". El menor riesgo de mortalidad se observó para un consumo de aproximadamente 5 porciones diarias de productos vegetales, en concreto: 2 de frutas y 3 de verduras, si bien una ingesta superior no se acompañó de una mayor disminución del riesgo (9).

Esta situación es especialmente preocupante en España, pues pese a ser un país productor de frutas y hortalizas de alta calidad, en la actualidad en España el consumo de productos vegetales, tanto en la población infantil y adolescente, según datos encuesta ENALIA, como en la población adulta mayores y embarazadas, ENALIA 2, se encuentra por debajo de la recomendación de 400g/día establecida por la OMS (10,11). Datos corroborados por el Informe de la Fundación Española de Nutrición en 2018 (12).

Los alimentos de origen vegetal son una fuente importante de micronutrientes y compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes como son la vitamina C (en su forma de ácido ascórbico y dehidroascórbico), la vitamina E (siendo la forma más activa el alfa-tocoferol), los carotenoides (con actividad como provitamina A como el beta-caroteno, o bien con otras funciones como el licopeno, los compuestos fenólicos (como los de las familias de flavonoides, flavonoles, antocianos...), y otras sustancias cuyo consumo tiene una clara incidencia positiva en nuestra salud) (13-15). Todos estos compuestos los podemos encontrar en frutos como los cítricos

(16) y hortalizas tanto cultivadas como silvestres (17), así como en cereales y legumbres (18). Todos ellos característicos de nuestra dieta mediterránea.

2.1 Micronutrientes y estimulación del sistema inmune

Ante nuestro objetivo de reforzar la función inmune, el primer escollo con el que nos encontramos es la enorme complejidad de este proceso y la multitud de factores involucrados, que hace que no siempre esté claro el efecto de los componentes de los alimentos sobre sus mecanismos.

El seguimiento de unas pautas dietéticas inadecuadas podría facilitar la infección o empeorar su evolución. Esto se ha visto en personas con sobrepeso y obesidad, convirtiéndose en un factor de riesgo de enfermedad grave de COVID-19. Es por ello que desde el comienzo de la pandemia distintos investigadores se han ocupado en analizar cómo una alimentación saludable, en el marco de una dieta variada y equilibrada, puede contribuir a mantener un mejor estado de salud, incluyendo un mejor funcionamiento del sistema inmune (19-22).

Los micronutrientes, como las vitaminas A, D, C, E y el mineral zinc, son necesarios para garantizar la integridad estructural y funcional de la piel y membranas mucosas, que tiene un efecto barrera y representan la primera línea de defensa contra patógenos invasores (21). Los procesos de inmunidad innata, como la proliferación y diferenciación celular, entre otros procesos, depende de cantidades adecuadas de vitaminas A, D, C, E, B₆, y B₁₂, folato, y minerales como hierro, zinc, cobre, selenio y magnesio. Del mismo

modo, la respuesta química, como es la activación del sistema del complemento y la liberación de citocinas proinflamatorias, requiere de la acción de ciertas vitaminas y minerales (en particular, vitaminas A, D y C, zinc, hierro y selenio). La respuesta inflamatoria cierra la brecha entre la inmunidad innata y adaptativa, y está regulada por las vitaminas A, C, E, y B₆, así como hierro, zinc y cobre. Del mismo modo, la respuesta inmune adaptativa, que incluye aquella mediada por células y la inmunidad humoral, depende nuevamente de la presencia de una variedad de micronutrientes en todas las etapas (proliferación, diferenciación y función de linfocitos, e inmunidad mediada por células). Al mismo tiempo, los micronutrientes participan en la autoprotección de las células inmunitarias (a través de mecanismos antioxidantes, por ejemplo, vitaminas C y E, zinc, hierro, magnesio, cobre y selenio), acciones inhibitoras (vitaminas D, B₆ y E) y eliminación de células agostadas mediante apoptosis y aclaramiento (lo que limita el daño tisular), acción realizada por la vitamina C (20,21).

Otros compuestos bioactivos, como los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 (ácidos α -linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico) pueden estimular el sistema inmunitario por diferentes mecanismos. Por ejemplo, mejorando la proliferación y la actividad de las células B o disminuyendo la producción de citoquinas y de prostaglandinas proinflamatorias (19). Muchas bacterias ácido-lácticas que forman parte de la microbiota intestinal, como son los lactobacilos y bifidobacterias, pueden competir con otros microorganismos patógenos a nivel del colon, modulando además la respuesta inmune por diferentes mecanismos (23).

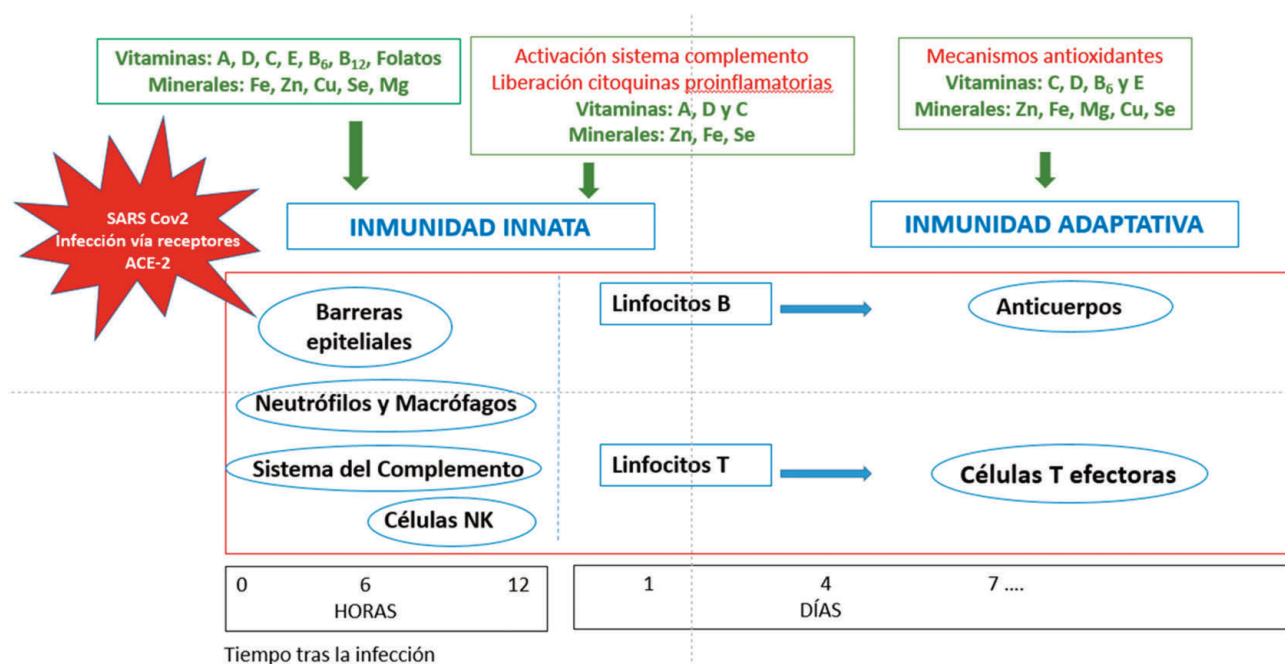


Figura 1.- Relación de los micronutrientes con la respuesta inmune innata y adaptativa. Basado en: 20,21



Por tanto, cada etapa de la respuesta inmune depende de la presencia de ciertos micronutrientes y compuestos bioactivos, que producen un efecto beneficioso sinérgico basado en sus mecanismos de acción complementarios, como se puede observar en la Figura 1. Un mecanismo importante es la actividad antioxidante que presentan determinados alimentos, por su composición en nutrientes y compuestos bioactivos. Esta actividad antioxidante permite reducir los niveles de la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2), la cual se ha considerado un receptor en las superficies celulares para el SARS-CoV-2 (21).

De todos los micronutrientes anteriormente mencionados, la vitamina D es la que ha demostrado más efectos positivos contra la enfermedad COVID-19, ya que se asocia tanto con una disminución de las tasas de infección como con mejores resultados para los pacientes. La vitamina D es reconocida por su papel en la regulación del metabolismo del calcio y el fosfato, así como en el mantenimiento de la mineralización ósea. También se considera como hormona inmunomoduladora. La vitamina D mejora la barrera física contra los virus, estimula la producción de péptidos antimicrobianos, y activa a células defensivas como los macrófagos que podrían destruir el SARS-CoV-2. Puede prevenir las tormentas de citoquinas al disminuir la producción de citoquinas inflamatorias (24,25) y mantener la integridad endotelial. Además, la vitamina D es un regulador clave del sistema renina-angiotensina (enzima convertidora de angiotensina 2, ACE2), que es aprovechado por el SARS-CoV-2 para entrar en las células huésped (26,27).

Debe tenerse en cuenta que actualmente varios estudios epidemiológicos destacan la deficiencia de vitamina D en la población general, ya sea por baja exposición solar o por una dieta baja en grasas, siendo niños pequeños, ancianos y personas obesas, los grupos poblacionales más susceptibles a sufrir esta hipovitaminosis (28), lo que les haría también más vulnerables para esta enfermedad.

Para validar las evidencias científicas encontradas hasta el momento actual, se encuentran en curso diferentes ensayos clínicos que evalúan si el uso de complementos alimenticios (incluyendo vitamina C, D y Zn) puede reducir el riesgo de infección con síndrome respiratorio agudo severo, o reducir el riesgo de hospitalización, morbilidad y / o mortalidad en participantes diagnosticados con COVID-19. De ellos, solo hay un ensayo clínico terminado (NCT: 04810949) realizado (durante 6 meses) en 41 pacientes con niveles séricos de vitamina D \pm 20 ng / ml. Se trata de un ensayo clínico aleatorizado comparativo que evaluó el efecto de 2 tratamientos en el personal de salud del Hospital Clínica Nova (México). El estudio finalizó el pasado 1 de marzo de 2021, y los resultados aún no se han publicado (29). Todos estos estudios en marcha son prometedores, pero aún no son concluyentes.

3. EVIDENCIA CIENTÍFICA - DECLARACIONES DE PROPIEDADES SALUDABLES

Como marco legal y certificación de la evidencia científica haremos referencia a las Declaraciones de Propiedades Saludables autorizadas por la Comisión Europea al tener un dictamen científico favorable de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) de acuerdo con el Reglamento 1924/2006 (30,31).

Tabla 1.- Declaraciones de propiedades saludables autorizadas por EFSA en relación a la protección del daño oxidativo y la estimulación de la función inmune.

PROTECCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO	
<i>Contribuye a la protección del ADN, proteínas y lípidos del daño oxidativo</i>	
Vitamina C	Cobre
Vitamina B2	Manganeso
Vitamina E	Selenio
	Zinc
ESTIMULACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNE	
<i>Contribuye a la función normal del sistema inmune</i>	
Vitamina A	Cobre
Vitamina B ₆	Hierro
Vitamina B ₉ (ác. Fólico)	Selenio
Vitamina B ₁₂	Zinc
Vitamina D	
<i>Ayuda al mantenimiento del sistema inmune como parte de las defensas del organismo</i>	
Vitamina C	
<i>Contribuye al mantenimiento del normal funcionamiento del sistema inmune durante y tras la realización de ejercicio físico intenso</i>	
Vitamina C	
<i>Contribuye a la función normal del sistema inmune en niños</i>	
Vitamina D	

Basado en: EU Register on nutrition and health claims (32).

INR = Ingestas Nutricionales de Referencia; AI: Adequate intake (aporte satisfactorio).

Tabla 2.- Alimentos que pueden ser considerados como fuente de los micronutrientes para los cuales se ha autorizado alguna Declaración de Salud en relación a su contribución al normal funcionamiento del sistema inmune.

Micronutriente	Ingesta Nutriente Referencia (INR) / Aporte satisfactorio (AI)	Alimentos que constituyen sus fuentes naturales más abundantes
VITAMINAS		
Vitamina A y carotenoides, como equivalentes de retinol	INR: 600 – 750 µg/día	Huevos. Hígado (cerdo, vacuno). Hortalizas (espinacas, zanahorias, calabaza, boniatos) Lácteos (quesos, mantequilla)
Vitamina B₆	INR: 1,2 – 1.7 mg/día	Frutos secos (pistacho, pipas de girasol, nuez) Legumbres (lenteja, cacahuete) Pescados (sardina, boquerón, salmón, palometa, caballa) Carne (cordero); hígado (cerdo, vacuno)
Vitamina B₉ (ácido fólico y derivados)	INR: 270 – 330 µg/día	Hígado (cerdo, pollo). Legumbres (soja, alubias, lenteja, habas, garbanzo) Frutos secos (cacahuete) Verduras (espinaca, acelga, espárrago verde, cebollino, col rizada, endivia, puerro, escarola)
Vitamina B₁₂	INR: 2,2 – 2.4 µg/día	Huevos y lácteos (quesos) Pescados y mariscos Carne y vísceras
Vitamina C	INR: 60 - 75 mg/día	Frutos (kiwi, cítricos, fresa, piña, frambuesa, grosella, papaya, guayaba) y hortalizas (pimiento, especies del género Brassica), preferiblemente en estado crudo.
Vitamina D	INR: 10 - 12,5 µg/día	Carne (cordero, cabrito) y vísceras Huevos y lácteos (mantequilla) Pescados y mariscos
ELEMENTOS MINERALES		
Cobre	INR: 1 - 1,3 mg/día	Frutos secos (almendras) Legumbres (alubia, habas, lenteja, soja) Cereales integrales (avena, trigo, arroz) y sus derivados
Hierro	AI: 9 - 18 mg/día	Carne y derivados (vacuno, cordero, avestruz, hígado, morcilla) Pescados (sardinas, bacalao) y mariscos (almejas, berberechos, langostinos, calamar, mejillón). Legumbres (lenteja, alubia, soja, haba) Frutos secos (pistacho, sésamo)
Selenio	INR: 45 - 70 µg/día	Carne (cerdo, avestruz) y vísceras. Huevos Cereales integrales (trigo, centeno) y sus derivados Pescados y mariscos Frutos secos (anacardo, sésamo, pipas de girasol)
Zinc	INR: 8 - 11 mg/día	Cereales integrales (trigo, avena) y sus derivados Legumbres (altramuz, soja) Frutos secos (pipas de girasol, pipas de calabaza, sésamo)

Basado en: (22,32-35)



Respecto a las propiedades antioxidantes es preciso decir que solo siete micronutrientes (vitaminas y minerales) han mostrado suficiente grado de evidencia para poder alegar sus propiedades beneficiosas en relación a la protección del daño producido por el estrés oxidativo sobre el ADN, proteínas y grasas (32). Por otro lado, diez micronutrientes (vitaminas y minerales) han mostrado con suficiente grado de evidencia contribuir al correcto funcionamiento del sistema inmune si se consumen en cantidades suficientes para cubrir los requerimientos nutricionales diarios (32). La actividad antioxidante la ejercen por distintos mecanismos, captación de radicales libres, prevenir la propagación de la peroxidación lipídica e inhibir la inflamación.

En la Tabla 1 se muestran las declaraciones de propiedades saludables autorizadas por EFSA en relación a la protección del daño oxidativo y la estimulación de la función inmune hasta la fecha. Hay que incidir, en que el papel beneficioso derivado de la ingesta de estos micronutrientes es una contribución a dichas funciones, no una garantía de inmunidad.

3.1 Alimentos como fuente de micronutrientes antioxidantes y estimulantes de la función inmune

No hay un único grupo de alimentos que contenga todos los compuestos beneficiosos e involucrados en la mejora de la función inmune, sino que es una dieta variada y equilibrada lo que hace que todos los compuestos involucrados en dichas funciones puedan actuar de forma sinérgica. En la Tabla 2, se muestran los alimentos fuente de los micronutrientes para los que se ha autorizado la declaración de salud "contribuye al normal funcionamiento del sistema inmune", así como las ingestas de referencia para la población española de acuerdo con AESAN, 2019 (33). Para la consideración de "fuente" de un determinado micronutriente se hace referencia al cumplimiento de los requisitos del Reglamento 1169/2011, contenido mínimo de un 15% de los valores de referencia de nutrientes para cada caso concreto (34).

En algunos casos los requerimientos de los micronutrientes anteriormente mencionados no se pueden cubrir a través de la ingesta de alimentos y por ello puede ser necesario el uso adecuado de complementos alimenticios (36).

Hay que recordar que no existen complementos alimenticios que eviten la infección por ningún tipo de virus u otro agente patógeno, y, por lo tanto, no puede haber ningún producto en el mercado con tales declaraciones. Pese a ello, las autoridades europeas han observado que cada vez más productos vendidos a través de Internet se anuncian alegando tener un efecto positivo en el sistema inmunológico o que protegen contra la infección por coronavirus (37). Hasta ahora, la evidencia científica no respalda ninguna afirmación de que cualquier alimento o complemento alimenticio proteja contra la enfermedad COVID-19 (38).

La Sociedad Internacional de Inmunización (ISIIN), recomienda, en personas de edad avanzada, el aumento de la ingesta de nutrientes que han demostrado mejorar la inmunidad de las células T y B (anticuerpos), como son vitamina C, D y E, así como el mineral Zn, en cantidades muy superiores a sus requerimientos, como puede observarse en la Tabla 3 (38). La suplementación con Vitamina D en pacientes hospitalizados también es recomendada por la Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología para mejorar el equilibrio inmunitario y prevenir la tormenta de citoquinas hiperinflamatorias (40).

4. ALIMENTACIÓN SOSTENIBLE

Un Sistema Alimentario Sostenible es un sistema alimentario capaz de proporcionar seguridad alimentaria y nutrición para toda la población, de manera que no se comprometan los mecanismos económicos, sociales y ambientales para que las generaciones futuras puedan contar con alimentos nutritivos en cantidad suficiente, dentro del concepto de economía circular (42).

Tabla 3.- Requerimientos nutricionales de micronutrientes: vitaminas C, D, E, y mineral Zn, establecidas por distintos organismos, en comparación con las recomendaciones ISIN para personas de edad avanzada en situación COVID.

Micronutriente	ISIN, 2020	AESAN, 2019	EFSA, 2017
Vitamin C	200 mg - 2 g/día	INR: 60 - 75 mg/día	PRI: 70-110 mg/día
Vitamin D	10 µg - 100 µg/día	INR: 10 - 12,5 µg/día	AI: 15 µg/día
Vitamin E	134 mg - 800 mg/día	INR: 11 - 13 mg/día	AI: 11-13 mg/día
Zinc	30 mg - 220 mg/día	INR: 8 - 11 mg/día	PRI: 7,4 - 11,7 mg/día

Basado en: 33,39,41.

INR = Ingestas Nutricionales de Referencia; PRI: Population Reference Intake (referencia nutricional para población); AI: Adequate intake (aporte satisfactorio)

Una alimentación saludable y sostenible es un modelo de alimentación que tiene como objetivo afrontar tanto las preocupaciones de salud como las ambientales asociadas a la producción y consumo de alimentos. La pandemia de COVID-19 en la que estamos aún inmersos ha supuesto una amenaza global sin precedentes que ha alterado la vida de miles de millones de personas alrededor del planeta y ha puesto en peligro la economía global (43). A finales de 2019 todos estábamos muy concienciados de la importancia de cuidar nuestro entorno. El preservar la salud humana en tiempos de la COVID-19 ha eclipsado estas preocupaciones que, es momento de retomar. Hay que definir estrategias para el periodo post-COVID-19 que permitan retomar la senda de crecimiento sostenible (44).

Los cambios en la dieta no solo pueden mejorar la salud y prevenir enfermedades; también pueden ayudar a reducir la huella medioambiental, disminuir el uso de recursos naturales y contribuir al cuidado del medio ambiente. En este contexto surge el nuevo concepto de “dieta de salud planetaria”, que considera la relevancia de las elecciones dietéticas, por su implicación tanto para la salud humana como para el medio ambiente, manteniendo los recursos disponibles: agua, tierra y suelo (45). Se estima que el duplicar la ingesta de frutas, verduras, legumbres y nueces, y reducir el consumo de carnes rojas y procesadas y azúcares añadidos al menos a la mitad, se pueden llegar a evitar más de 10 millones de muertes por año, lo que supondría una reducción de 19 – 23.6% en las cifras actuales de mortalidad (46). Coincide que los alimentos de origen vegetal son los que menor impacto medioambiental negativo producen medido en términos de: emisión de gases de efecto invernadero, requerimientos de uso de tierra y energía, así como un menor impacto en la acidificación y eutrofización de los suelos.

Se debe por tanto potenciar el consumo de productos vegetales. No es necesario llegar a imponer dietas veganas estrictas que pueden llevar asociados déficits nutricionales, sino abogar por dietas “flexitarianas”, o de manera general por dietas en las que todos los alimentos están presentes pero los productos vegetales son los predominantes (47). Además, son los productos vegetales los que actualmente sufren los niveles más altos de pérdida y desperdicio, cuestión que debe ser reducida al máximo. Esta necesidad ha llevado a Naciones Unidas a declarar el 2021 como el año internacional de la frutas y verduras (48). Durante este año los países pondrán énfasis en fomentar dietas más saludables y ricas en frutas y verduras, que además de ser sostenibles y amigables con la lucha contra el cambio climático.

El conseguir establecer un sistema agroalimentario sostenible permitirá la consecución de los objetivos fijados por Naciones Unidas en la Declaración de Roma (2015): Promover sistemas alimentarios sostenibles mediante la formulación de políticas públicas coherentes desde la producción hasta el consumo y en todos los sectores pertinentes; así como los establecidos en la Estrategia Europea FOOD 2030 (49,50).

5. CONCLUSIONES

El mantenimiento de los sistemas defensivos del organismo permite afrontar mejor las situaciones de riesgo, como las derivadas de la actual pandemia COVID-19, además de seguir unas pautas higiénicas adecuadas, y potenciar la vacunación, debemos cuidar el estatus nutricional con especial incidencia en los siguientes micronutrientes con efecto antioxidante y protector del sistema inmune: vitaminas (A, D, C, E, B₆, B₁₂ y folatos) y minerales (hierro, zinc, cobre, selenio y magnesio).

Hoy en día ya no es suficiente que los alimentos sean seguros para la población, cuestión claramente indiscutible, es necesario además que sean respetuosos con el planeta, nuestro hábitat que debemos preservar. Deben ser accesibles a todos en cualquier región del mundo, minimizando las desigualdades siendo adecuados a cada etapa y circunstancia de la vida incluso aquellas imprevistas como la pandemia COVID-19.

El conocimiento científico debe ser de utilidad para la sociedad. En este sentido, los profesionales de la salud debemos trabajar juntos potenciando en la población una alimentación saludable y sostenible, es decir, aquella que nos permite mantener un buen estado de salud, utilizando adecuadamente los recursos disponibles y contribuyendo, por tanto, a mantener el ecosistema.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la Sección 5 de la RANF por haber apoyado mi candidatura a formar parte de esta Corporación y a la Junta de Gobierno por haberlo ratificado. La Real Academia de Farmacia ha formado parte de toda mi vida profesional. Aquí recibí mi primer Premio de investigación. He colaborado en publicaciones con distintos Académicos y he asistido a multitud de conferencias, todas ellas de gran valor. A ella pertenecen, y han pertenecido, mis más ilustres profesores, y entre todos ellos el Profesor Dr. D. César Nombela Cano un referente científico y humano y quien hoy me presenta. El Dr. Nombela fue mi profesor de Microbiología, ya en el periodo postdoctoral siguió mis pasos en la andadura americana. En 2013 me dio la gran oportunidad de incorporarme al Claustro de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo (UIMP) donde me permitió realizar tareas de Gestión Universitaria, una experiencia que supuso un salto cualitativo en mi desarrollo personal y profesional. Gracias César por tus palabras, por tu generosidad, por todas tus enseñanzas y lo más valioso, tu amistad; y por acompañarme en este nuevo reto. Gracias a la Presidenta de la Sección 5 por haberme permitido contextualizar mi discurso a la situación ahora a todos nos preocupa y ocupa, la pandemia COVID-19.

Agradezco muy sinceramente a todos aquellos que a lo largo de mi vida personal y profesional me han apoyado y acom-



pañado hasta llegar hoy aquí. A mi familia, soy hija de padres farmacéuticos que me han transmitido la pasión y respeto por esta profesión, y han apoyado todas mis iniciativas. A mis amigos, la familia elegida, que siempre me han acompañado.

En el ámbito profesional, a las Doctoras Esperanza Torija y Carmen Díez, mis directoras de Tesis Doctoral, el primer gran proyecto de todo investigador. A mis compañeros de Departamento, y a muchos amigos profesores de la Facultad de Farmacia de la UCM, mi casa. A la familia UIMP, magníficos profesionales y amigos, que de la mano del Rector Nombela y Lora Tamayo hemos trabajado juntos por un bien común, la excelencia académica. Al Dr. Charles Shoemaker de la Universidad de California, que ha hecho del Campus de Davis mi segunda casa. Y muy especialmente a mi grupo de investigación, a mis compañeras con las que comparto mi día a día y a todos los doctorandos de los que tanto he aprendido y seguimos creciendo juntos.

A todos, muchas gracias.

6. REFERENCIAS

1. FAO. El estado de la seguridad alimentaria y nutrición en el mundo. SOFI2020. Disponible en: (fao.org/publications/sofi/2020/es/).
2. IPCC. Climate change and land. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, 2019. Disponible en: (ipcc.ch/srccl/).
3. OMS. Principales causas de muerte y discapacidad en el mundo: 2000-2019. Disponible en: (who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019)
4. FAO. Hambre e inseguridad alimentaria. Disponible en: (fao.org/hunger/es/).
5. AEMPS. Vacunas contra la COVID-19. Disponible en: (aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%919/vacunas-contrala-covid%E2%80%919/).
6. WHO. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. Disponible en: (who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).
7. GBD Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2019; 11, 393(10184):1958-1972. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8.
8. Wang DD, Li Y, Bhupathiraju SN, Rosner BA, Sun Q, Giovannucci EL, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Fruit and Vegetable Intake and Mortality: Results From 2 Prospective Cohort Studies of US Men and Women and a Meta-Analysis of 26 Cohort Studies. *Circulation* 2021; 1:43 00-00. doi: 10.1161/CIRCULATION-AHA.120.048996
9. Wang DD, Li Y, Bhupathiraju SN, Rosner BA, Sun Q, Giovannucci EL, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Fruit and Vegetable Intake and Mortality: Results From 2 Prospective Cohort Studies of US Men and Women and a Meta-Analysis of 26 Cohort Studies. *Circulation*. 2021; Mar 1. doi: 10.1161/CIRCULATION-AHA.120.048996.
10. AECOSAN - Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta ENALIA. Encuesta Nacional de Alimentación en la población Infantil y Adolescente. Disponible en: (aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia.htm).
11. AECOSAN - Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta ENALIA 2. Encuesta Nacional de Alimentación en población adulta, mayores y embarazadas. Disponible en: (aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia_2.htm).
12. FEN 2018. Informe de estado de situación sobre: Frutas y hortalizas, nutrición y salud en la España del S XXI. Disponible en: (fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/informe_frutas_y_hortalizas_fen_2018-v1.pdf)
13. Cámara M, Sánchez Mata, MC, Torija, ME. Frutas y verduras fuente de salud. Monografía nº 8. Colección Nutrición y Salud. Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Consumo Comunidad de Madrid. 2003.
14. García-Herrera P, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Tardío J, Olmedilla-Alonso B. Carotenoid content of wild edible young shoots traditionally consumed in Spain (*Asparagus acutifolius* L., *Humulus lupulus* L., *Bryonia dioica* Jacq. and *Tamus communis* L.). *J Sci Food Agric*, 2013; 93:1692–1698. doi: 10.1002/jsfa.5952
15. Cámara M, Sánchez-Mata MC, Fernández-Ruiz V, Cámara RM, Manzoor S, Cáceres JO. Chapter 11 — Lycopene. A review of chemical and biological activity related to beneficial health effects. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2013; 40:383–426.
16. Cebadera-Miranda L, Morales P, Cámara M. Chapter 27. Bioactive compounds in oranges from the Mediterranean climate area. En *The Mediterranean Diet: An evidence-based approach*. Ed. Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson. Academic Press, Elsevier, 2020.
17. Sánchez-Mata MC, Tardío J. Eds. *Mediterranean Wild Edible Plants. Ethnobotany and Food Composition Tables*. Springer. 2016.
18. Ciudad-Mulero M, Matallana-González MC, Cámara M, Fernández-Ruiz V, Morales P. Antioxidant phytochemicals in pulses and its relation to human health: A Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2020; 26:1880-1897. doi: 10.2174/1381612826666200203130150.



19. Barcina Angulo, Y. Dieta, nutrientes y COVID-19. Noticiero Real Academia Nacional de Farmacia. Disponible en: (ranf.com/noticia/13806/).
20. Calder PC. Nutrition, immunity and COVID-19. *British Medical Journal* NPH 2020; 3:1,74-92, e000085. Doi:10.1136/ bmjnph-2020-000085
21. Mrityunjaya M, Pavithra V, Neelam R, Janhavi P, Halami PM, Ravindra PV. Immune-Boosting, Antioxidant and Anti-inflammatory Food Supplements Targeting Pathogenesis of COVID-19. *Front Immunol.* 2020; Oct 7;11:570122. doi: 10.3389/fimmu.2020.570122.
22. Cámara M, Sánchez-Mata MC, Fernández-Ruiz V, Cámara RM, Cebadera E, Domínguez L. A review of the role of micronutrients and bioactive compounds on immune system improvement to fight against the COVID-19 disease. *Foods* 2021; 10, 1088. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10051088>
23. Wu D, Lewis ED, Pae M, Meydani SN. Nutritional modulation of immune function: analysis of evidence, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Immunol.* 2019; 9:3160. doi: 10.3389/fimmu.2018.03160
24. Bae M, Kim H. Mini-Review on the Roles of Vitamin C, Vitamin D, and Selenium in the Immune System against COVID-19. *Molecules* 2020; 25,22:5346. doi: 10.3390/molecules25225346
25. Ku Kumar R, Rath H, Haq A, Wimalawansa SJ, Sharma A. Putative roles of vitamin D in modulating immune response and immunopathology associated with COVID-19. *Virus Res.* 2021; 292:198235. doi:10.1016/j.virusres.2020.198235
26. Iddir M, Brito A, Dingo G, Fernandez Del Campo SS, Samouda H, La Frano MR, Bohn T. Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. *Nutrients* 2020; 12,6:1562. Doi:10.3390/nu12061562.
27. Shakoor H, Feehan J, Al Dhaheer AS, Ali HI, Platat C, Ismail LC, Apostolopoulos V, Stojanovska L. Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? *Maturitas* 2021; 143:1-9. Doi:10.1016/j.maturitas.2020.08.003
28. Laird, E.; Rhodes, J.; Kenny, R.A. Vitamin D and Inflammation: Potential Implications for Severity of Covid-19. *Ir. Med. J.* 2020, 113(5), 81. PMID: 32603576.
29. NCT04810949. Effect of Vitamin D Supplementation on the Development of Respiratory Infections (COVID-19) in Health Personnel at Hospital Clínica NOVA With Serum Values > 20ng / ml. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04810949?term=vitamin+D&recrs=eh&type=Intr&cond=Covid19&draw=3&rank=5>
30. European Parliament and Council of the European Union. Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. *Off. J. Eur. Union* 2006, L404/26. Disponible en: (eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32006R1925).
31. Domínguez Díaz L, Fernández-Ruiz V, Cámara M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *J. Funct. Foods* 2020, 68:103896. Doi:10.1016/j.jff.2020.103896
32. EU Register of nutrition and health claims made on foods. Disponible en: (ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home).
33. AESAN Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 2019, 29: 43-68.
34. European Parliament and Council of the European Union. Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Off. J. Eur. Union* 2011, L304/18. Disponible en: (eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32011R1169).
35. BEDCA. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. Red BEDCA y AESAN. Disponible en: (bedca.net).
36. Domínguez Díaz L, Fernández-Ruiz V, Cámara M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* 2019, 60(10), 1738-1746. Doi:10.1080/10408398.2019.1592107.
37. European Commission. Action plan on online offers and advertising of food related to COVID-19. Disponible en: (ec.europa.eu/food/safety/official_controls/eu-coordinated-control-plans/covid-19_en).
38. WHO. Coronavirus disease (COVID-19): Food safety and nutrition. Disponible en: (who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-food-safety-and-nutrition).
39. ISIN. International Society of Immunonutrition. Position Statement on Nutrition, Immunity and COVID-19. Disponible en: (immunonu-



- trition-isin.org/docs/isinComunicadoCovid19.pdf).
40. Tarazona-Santabalbina FJ, Cuadra L, Cancio JM, Roca Carbonell F, Pérez-Castejón Garrote JM, Casas-Herrero A, Martínez-Velilla N, Serra-Rexach JA, Formiga F. Vitamin D supplementation for the prevention and treatment of COVID-19: a position statement from the Spanish Society of Geriatrics and Gerontology. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 2021. Doi:10.1016/j.regg.2021.02.001.
 41. EFSA European Food Safety Authority. Dietary Reference Values for nutrients Summary report. 2017. Disponible en: (efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.e15121).
 42. HLPE, 2014. Las pérdidas y el desperdicio de alimentos en el contexto de sistemas alimentarios sostenibles. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. Roma, 2014. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/hlpe/hlpe_documents/HLPE_Reports/HLPE-Report-8_ES.pdf
 43. ONU. Consumo en tiempos de la COVID-19 Estilos de vida sostenibles en el hogar Disponible en: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/32175/GUIA_CONSUMO_SOSTENIBLE.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 44. Blay-Palmer A, Carey R, Valette E, Sanderson MR. Post COVID 19 and food pathways to sustainable transformation. *Agric Human Values*. 2020; May 18:1-3. doi:10.1007/s10460-020-10051-7
 45. Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, Garnett T, Tilman D, DeClerck F, Wood A, Jonell M, Clark M, Gordon LJ, Fanzo J, Hawkes C, Zurayk R, Rivera JA, De Vries W, Majele Sibanda L, Afshin A, Chaudhary A, Herrero M, Agustina R, Branca F, Lartey A, Fan S, Crona B, Fox E, Bignet V, Troell M, Lindahl T, Singh S, Cornell SE, Srinath Reddy K, Narain S, Nishtar S, Murray CJL. Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet*. 2019 Feb 2;393(10170):447-492. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.
 46. Global Burden of Disease 2020. Disponible en: (thelancet.com/gbd).
 47. Derbyshire EJ. Flexitarian Diets and Health: A Review of the Evidence - Based Literature. *Front Nutr*. 2017, 3:55. doi:10.3389/fnut.2016.00055
 48. FAO 2021 Año internacional de la frutas y verduras. Disponible en: (fao.org/fruits-vegetables-2021/es/).
 49. WHO 2017. Ambition and Action in Nutrition 2016-2025. Disponible en: (fao.org/3/CA1435EN/ca1435en.pdf).
 50. Comisión Europea. FOOD 2030: la investigación innovadora de la Unión Europea garantiza que el sistema alimentario esté preparado para el futuro. Disponible en: (cordis.europa.eu/article/id/400948-food-2030-innovative-eu-research-ensures-food-system-is-future-ready/es).

Si desea citar nuestro artículo:
**Alimentación saludable y sostenible en tiempos
de la pandemia covid-19**
Montaña Cámara Hurtado
An Real Acad Farm [Internet].
An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 195- 204
DOI: <http://>

EL ESCUALENO, UNA MOLÉCULA PALPITANTE A PESAR DE LOS CIENTO CINCO AÑOS DE SU DESCUBRIMIENTO

SQUALENE, A VIBRANT MOLECULE DESPITE ITS ONE-HUNDRED-FIVE-YEAR OLD DISCOVERY

Jesús De la Osada García

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón-Universidad de Zaragoza, Zaragoza

² Instituto Agroalimentario de Aragón, CITA-Universidad de Zaragoza

³ CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III

corresponding author: josada@unizar.es

REVISIÓN

RESUMEN

El escualeno es un compuesto hidrocarbonado intermediario en la biosíntesis de fitosteroles y terpenos en plantas y del colesterol en animales con una larga tradición de investigación que se inició en 1916. La reciente investigación de sus efectos biológicos ha evidenciado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiateroscleróticas. Es un compuesto que se acumula en el hígado de los animales que lo consumen sin que este hígado graso repercuta en la longevidad de dichas especies. Este acúmulo de escualeno modula redes de expresión génica y regula los niveles postranscripcionales de diversas proteínas. La combinación del escualeno con otras sustancias bioactivas es un campo ilimitado de exploración que puede conducir a la formulación de nuevos alimentos funcionales para controlar enfermedades asociadas al estrés oxidativo y el envejecimiento en humanos y en medicina veterinaria.

Sus múltiples usos en dermofarmacia o como adyuvante de vacunas lo convierten en una molécula codiciada. Aunque tradicionalmente se ha obtenido de los tiburones, el impacto de su captura con este fin es de tal magnitud que resulta imperante la búsqueda de alternativas. Esta búsqueda de nuevas fuentes para poder cubrir su demanda plantea nuevos retos tecnológicos.

ABSTRACT

Squalene is a hydrocarbon intermediary involved in the biosynthesis of phytosterols and terpenes in plants and of cholesterol in animals. Its discovery backs to 1916. Recent research on biological effects has shown this compound to display antioxidant, anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties. When animals accumulate in the liver, this fatty liver does not influence their longevity, but influences both gene expression networks and post-transcriptional protein levels. Combination of squalene with other biological compounds is an open aspect to develop functional food to control oxidative stress and aging in human and veterinary medicine.

Its current use in cosmetics or as vaccine adjuvant makes of it a coveted molecule. Traditionally, sharps have been its source. However, the impact of their capture for this purpose is unsustainable and the search for new sources is highly required. The quest for those in order to reach the demand poses new technological challenges.

Palabras Clave:

Escualeno
Adyuvante
Hígado graso
Aterosclerosis

Keywords:

Squalene
Adjuvant
Fatty liver
Atherosclerosis



1. INTRODUCCIÓN

Estructura del escualeno

El escualeno es un hidrocarburo cuya fórmula corresponde al $C_{30}H_{50}$, posee seis metilos y seis dobles enlaces y su nombre oficial aprobado por la IUPAC es (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexametil tetracosa- 2,6,10,14,18,22- hexaeno (1). Su biosíntesis en plantas y animales utiliza elementos de carbono de 5 unidades denominados isoprenos y al ser un compuesto que utiliza un múltiplo de seis unidades del mismo, se le considera un isoprenoide, concretamente un triterpeno lineal.

Descubrimiento

Fue en 1916 cuando el químico japonés Mitsumaru Tsujimoto aisló y caracterizó este compuesto. Puso de manifiesto su abundancia en el aceite de hígado de tiburón y formuló que podría utilizarse para identificar aceites y grasas (2). En los años siguientes, prosiguió con sus investigaciones y confirmó el hallazgo en varias especies de tiburones y a raíz de esto, lo denominó escualeno (3).

Destino metabólico

Desde entonces, numerosos trabajos han permitido establecer que el escualeno es un intermediario en la biosíntesis de colesterol. Utilizando la unidad de 5 carbonos de isopreno, antes mencionada y en diversas etapas metabólicas se forma el escualeno, a partir del cual mediante ciclación se originará el colesterol (4).

En plantas, el origen del escualeno es compartido con animales, pero su destino metabólico cambia y origina los fitosteroles y una gama amplísima de terpenos. Solo en el fruto del olivo se han encontrado alcoholes como el uvaol y el eritrodiol y compuestos terpénicos ácidos como el máslnico, el oleanólico y el ursólico (5).

2. NUESTRO INTERÉS

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en el estudio de las propiedades antiaterogénicas del aceite de oliva virgen. Este es el zumo oleoso del fruto de la *Olea europea* separado de los demás componentes del fruto. Esto permite que ciertos componentes presentes en el fruto puedan pasar al aceite en tanto que están ausentes en los procedentes de semillas, que siempre requieren una extracción con disolventes.

Los constituyentes del aceite de oliva virgen pueden clasificarse en dos grandes grupos: uno mayoritario, la fracción saponificable, y otro presente en menor proporción, los componentes minoritarios o fracción insaponificable.

La fracción saponificable representa el 99 %, la mayor parte de la cual son triglicéridos y en menor medida ácidos grasos libres, mono o diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides. El ácido graso más abundante es el ácido oleico (monoinsaturado),

con cantidades moderadas de los ácidos palmítico y linoleico y un bajo porcentaje de ácidos esteárico y linolénico, tal como se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de oliva.

Nombre común (Símbolo)	Porcentaje
Mirístico (14:0)	0,0 - 0,05
Palmítico (16:0)	7,5 - 20,0
Palmitoleico (16:1n7)	0,3 - 3,5
Margárico (17:0)	0,0 - 0,3
Heptadecenoico (17:1)	0,0 - 0,3
Esteárico (18:0)	0,5 - 5,0
Oleico (18:1n9)	55,0 - 83,0
Linoleico (18:2n6)	3,5 - 21,0
α -Linolénico (18:3n3)	0,0 - 0,9
Araquídico (20:0)	0,0 - 0,6
Eicosenoico (20:1n9)	0,0 - 0,4
Behénico (22:0)	0,0 - 0,2
Lignocérico (24:0)	0,0 - 0,2

Adaptada de (30)

La fracción insaponificable, también denominada componentes minoritarios del aceite de oliva virgen, contiene una gran variedad de compuestos. En la tabla 2, se recogen los principales grupos químicos junto con su rango de concentraciones. Como se aprecia en la misma, los hidrocarburos son los más abundantes y entre ellos destaca el escualeno y en menor cantidad los carotenos (la luteína y el β -caroteno) (6).

El contenido total de compuestos terpénicos supone una de las fracciones más abundantes y pueden ser de estructura tetracíclica o pentacíclica. De entre estos últimos, destacan dos alcoholes, el uvaol y el eritrodiol, y sus correspondientes ácidos, oleanólico y máslnico.

Los esteroides vegetales más abundantes en el aceite de oliva virgen: son el β -sitosterol, el Δ^5 -avenasterol y el campesterol (7).

Tabla 2. Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen.

Componentes minoritarios	Concentración (mg/ kg)
Hidrocarburos	1500-8000
Escualeno	1250-8000
Carotenos	0,5-5
Luteína	3-15
Compuestos terpénicos	1000-3000
Esteroles	800-2600
Compuestos fenólicos	20-900
Alcoholes alifáticos	100-200
Tocoferoles	50-300
Clorofilas A y B	0,2-5
Feofitinas A y B	0,2-20

Adaptada de (30)

Los compuestos fenólicos forman los constituyentes hidrosolubles y afectan a la estabilidad y sabor del aceite de oliva. El más abundante es el hidroxitirosol (8).

Los alcoholes alifáticos saturados de cadena lineal con número par de átomos de carbono comprendido entre 18 y 28 átomos de carbono, los tocoferoles, clorofilas y feofitinas completan la composición (7).

Tal como hemos comentado el escualeno aparece en una elevada concentración en la fracción insaponificable del aceite de oliva (60-75%). Puede constituir hasta el 90% de los hidrocarburos en el aceite de oliva virgen. El rango de contenido en los aceites de oliva virgen muestra una gran variabilidad desde 1,5 hasta 13 g/ kg en la que influyen diversos factores como variedades vegetales y procedimientos tanto agronómicos como de obtención de los aceites (5). Esta molécula es estable en el aceite de oliva virgen calentado a 180 °C durante 36 h, además se absorbe y permanece en el organismo. Por estas razones se ha pensado que puede jugar un importante papel en la acción del aceite de oliva virgen (9).

3. EXPLORACIÓN DEL PAPEL BIOLÓGICO

Nuestros estudios preclínicos con ratones humanizados se han encaminado a estudiar el efecto del papel del aceite de oliva virgen y sus componentes en el desarrollo de la aterosclerosis y los mecanismos implicados.

Para ello hemos utilizado el ratón carente de la apolipoproteína E. La ausencia de la misma impide que las partículas remanentes de los quilomicrones y las VLDL puedan eliminarse por el hígado, por lo que se acumulan en el plasma y finalmente se depositan en el espacio subendotelial de las paredes arteriales. Por ello, este ratón alimentado con la dieta normal desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea (10), que presenta la misma secuencia de formación de la lesión establecida en otros modelos animales y en humanos. La complejidad de las lesiones y su facilidad de generación de forma espontánea en un corto periodo de tiempo, junto con la semejanza del modelo con la enfermedad humana lo convierten en un sistema atractivo para estudiar los factores predisponentes de la aterosclerosis, tanto ambientales como genéticos. Entre los factores ambientales, hay que destacar la dieta como uno de los más importantes (11). En este campo, el empleo de este ratón nos ha permitido explorar el papel biológico de aceite de oliva virgen y sus componentes sobre el desarrollo de la aterosclerosis.

Utilizamos estos ratones alimentados con dietas con un 10 % (p/p) de dicho aceite y sin colesterol, en un intento de reproducir la clásica dieta mediterránea donde la principal fuente de grasa era ese aceite y el consumo de productos de origen animal con colesterol era muy limitado. Este porcentaje se eligió teniendo en cuenta que un ratón consume unos 3 g/ día de pienso y con el 10 % (p/p) de aceite, nuestros ratones estarían ingiriendo 0,3 g de aceite. Dado que cada animal pesa unos 30 g, la dosis consumida sería de 10 g de aceite/ kg de peso del animal. Extrapolando al peso medio humano (70 kg), los ratones que pesasen como un humano estarían consumiendo 700 g de aceite por día. Si se tiene en cuenta que el tono metabólico en el ratón es 10 veces más elevado (12), esa cantidad ya ajustada equivaldría a 70 g de aceite por día en humanos. Si lo valoramos en términos energéticos, este consumo de 70 g de aceite/ día a razón de 9 kcal/g de grasa supone una ingestión de 630 kcal que representan el 25 % de una dieta de 2.500 kcal para una persona media, cifra inferior a la ingesta de aceite de oliva en la dieta mediterránea clásica donde el 35 % de las calorías totales provenía de dicho aceite (13).

Estas dietas con un 10 % (p/p) de aceite de oliva virgen extra o 30% de las calorías y sin colesterol se administraron a los ratones durante 12 semanas y al cabo de dicho periodo, los animales se sacrificaron y se cuantificó el grado de lesión aterosclerótica

El escualeno, una molécula palpitante a pesar de los ciento cinco

años de su descubrimiento

Jesús De la Osada García

207

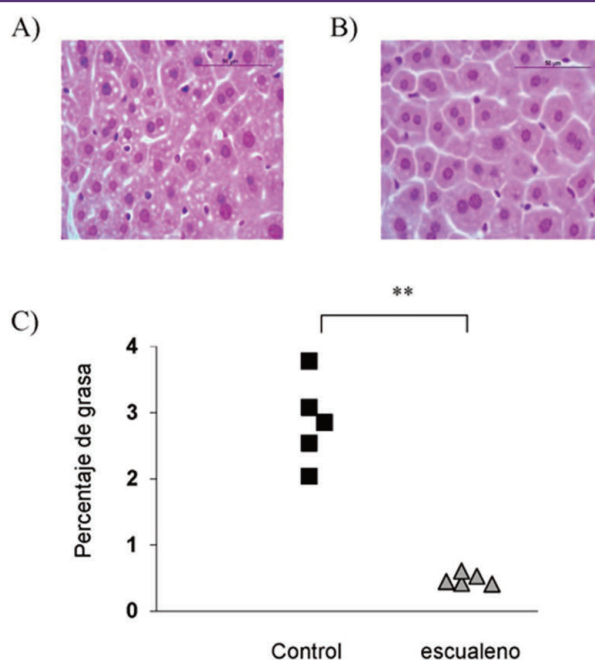


Figura 1. Efecto de la administración de escualeno sobre el grado de esteatosis hepática en ratones macho carentes de Apoe alimentados con dieta pobre en grasa. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la U de Mann-Whitney: **, $P < 0.001$ vs control. Adaptado de Ramírez-Torres et al. *J Proteomics* 77: 27–39, Copyright (2012), con permiso de Elsevier

presente. En dicho estudio, la administración de este porcentaje de aceite de oliva en la dieta retrasaba el desarrollo de la aterosclerosis (14).

En este mismo estudio, se incluyó un grupo de animales alimentado con un porcentaje similar de aceite de girasol de alto contenido en ácido oleico, lo que hacía que estos animales recibiesen el mismo porcentaje de ácido oleico que los animales alimentados con el aceite de oliva virgen extra. A pesar del similar contenido de este ácido graso en las dietas, los animales que consumieron la dieta de girasol con alto contenido de oleico no presentaron el descenso en la aterosclerosis. Esta observación permitió concluir que los triglicéridos con ácido oleico constituyentes del aceite de oliva virgen extra no eran los únicos responsables de su acción.

Para comprobar la implicación de los componentes minoritarios del aceite de oliva, se diseñó el siguiente experimento: Se prepararon aceites del mismo olivar con dos procedimientos diferentes: uno obtenido por prensado y otro por centrifugación. Ambos tipos de aceites se refinaron para eliminar el componente hidrosoluble. El procedimiento de centrifugado generó un aceite enriquecido en compuestos insolubles en agua de la fracción insaponificable tales como: fitosteroles, tocoferoles, triterpenos y ceras. Los dos tipos de aceites se administraron al 10% a los ratones. El aceite obtenido por prensado y refinado aumentó la lesión aterosclerótica, en tanto que el aceite de centrifugación, enriquecido en los componentes minoritarios e insolubles en agua y carente de compuestos hidrosolu-

bles, indujo una disminución de la aterosclerosis e indica que los compuestos liposolubles juegan un papel importante en el retraso del desarrollo de la lesión aterosclerótica (15).

Dado que el escualeno es el compuesto liposoluble más abundante como se mencionó anteriormente, se estudió su efecto. En este sentido, la administración de una dosis farmacológica de 1 g/ kg ratón/día de escualeno al ratón alimentado con la dieta pobre en grasa redujo el desarrollo de la aterosclerosis. En conclusión, este compuesto posee acción ateroprotectora y su administración es segura a dosis altas (16). De todos los parámetros estudiados para explicar este hallazgo, se observó que los cambios en grasa hepática estaban implicados y que el escualeno los disminuía (Figura 1) (17).

El papel de un correcto funcionamiento hepático y las repercusiones en la aterosclerosis cuando acumula grasa es un nuevo aspecto de investigación el cual nos ha sorprendido en los últimos años y es motivo de debate en la comunidad científica.

Para explicar dichos hallazgos, se efectuó un análisis proteómico y se observaron las características de las gotas lipídicas intracelulares.

El análisis proteómico reveló que proteínas implicadas en el metabolismo lipídico y lipoproteico, estrés oxidativo y ritmos circadianos están influenciados por la administración de escualeno (18).

Se abordó la distribución del escualeno en los orgánulos subcelulares y se vio que se acumulaba en las gotas lipídicas fundamentalmente (19). Estas gotas lipídicas fueron diferentes entre los dos

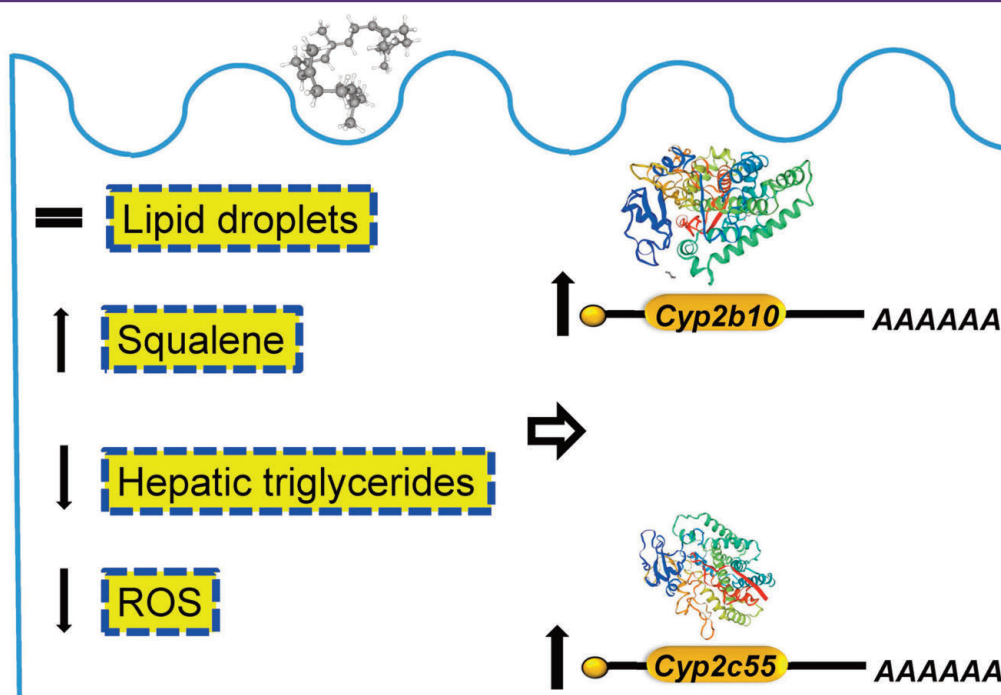


Figura 2. Representación esquemática de los efectos de la administración de escualeno en ratones macho carentes de Apoe alimentados con dieta rica en grasa. Adaptado de Gabas-Rivera et al. Mol Nutr Food Res 64: e2000354, Copyright (2020), con permiso de Wiley

sexos. En las hembras son más pequeñas ya que presentan menor expresión de la proteína que permite su crecimiento (20).

La administración de una dosis farmacológica de 1 g/ kg ratón/ día de escualeno al ratón alimentado con la dieta rica en grasa redujo el contenido hepático de triglicéridos y favoreció su acumulo (21). El acumulo de escualeno también se tradujo en un descenso del estrés oxidativo (Figura 2). Curiosamente, los animales que lo acumulan en el hígado como los tiburones del ártico viven al menos 272 años (22). Estos experimentos nos indican que las esteatosis hepáticas no son todas iguales y que la producida por el aporte de escualeno no ocasionaría el desarrollo de las complicaciones de esta patología como son la esteatohepatitis, la cirrosis y el hepatoma.

4. OTROS USOS ACTUALES

A parte de este potencial uso como suplemento nutricional, el escualeno es ampliamente usado como adyuvante de vacunas, en cosmética y en usos no biológicos como lubricante.

Como adyuvante para potenciar la respuesta inmune está presente en las vacunas de la gripe, rabia, clamidias, coronavirus (SARS-CoV y MERS-CoV) (23) y en las recientemente desarrolladas frente al coronavirus implicado en la COVID-19 (24).

El escualeno es el tercer componente más importante de la secreción grasa de la piel humana donde supone el 13% por de-

trás de triglicéridos y ceras (25). Al no taponar la glándula sebácea es un compuesto presente en preparados hidratantes para la piel ya sean cremas o lápices de labios. También se incluye en formulaciones con funciones emolientes y destoxificantes de este órgano ya que contribuye a reparar su daño oxidativo (25).

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

En resumen, las necesidades del escualeno para cubrir todas estas aplicaciones suponen un importante reto. Según la organización no gubernamental *Sharkallies*, para obtener una tonelada del compuesto se han de sacrificar entre 2500 y 3000 tiburones (26). Este mismo organismo estima que para vacunar a toda la población del planeta frente al SARS-CoV2 se precisarán sacrificar alrededor de 500.000 tiburones.

Esta ingente necesidad mundial de escualeno precisa nuevos abordajes que acaben con el sacrificio de los tiburones para obtenerlo de su reservorio hepático. Por ello, son muchas las iniciativas que van surgiendo, ya sea para aislarlo de plantas o protistas, producirlo por ingeniería bioquímica o por biología sintética en nuevos organismos convenientemente modificados.

- Algunas de las plantas que proporcionan gran cantidad de escualeno son el olivo (5) y *Artocarpus lakoocha* (27). Son varias las compañías que lo preparan a partir del olivo: *EKIZ Olive Oil & Soap*, *EFP Biotech*, *Jedwards International, Inc.* o *Wilshire Tech* (aceite de oliva) (26).



- Otra segunda fuente natural son los protistas del género *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a que acumulan un 13% de su peso como escualeno (28).
- Nuevos desarrollos tecnológicos a partir de caña de azúcar como el que ha desarrollado la empresa Amyris Biotecnología, (Emeryville, CA, USA) o la generación de nuevas levaduras por biología sintética que lo acumulen (29) y que ya explota la empresa Enepret Inc (Lexington, KY, USA) muestran la importancia de producir este compuesto de la máxima pureza, bajo coste y con el menor impacto ambiental.

6. CONCLUSIONES

- El escualeno es más que un intermediario metabólico en la biosíntesis de colesterol, fitosteroles y terpenos.
- Posee una amplia gama acciones importantes en varios sistemas biológicos.
- Su amplio uso industrial en cosmética y adyuvante de vacunas plantea importantes retos medioambientales.
- Son esos desafíos los que actúan como un motor de desarrollo biotecnológico para una producción más sostenible de este compuesto.

7. REFERENCIAS

1. Pubchem. 2021. Accesible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=C30H50>.
2. Tsujimoto M. A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *J Ind Eng Chem* 1916;8:889-96.
3. Tsujimoto M. Squalene: a highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *J Ind Eng Chem* 1920;12:63-72.
4. Lou-Bonafonte JM, Martínez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Herrera-Marcos LV, Sanchez-Marco J, et al. Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Mol Nutr Food Res*. 2018:e1800136.
5. Martínez-Beamonte R, Sanclemente T, Surra JC, Osada J. Could squalene be an added value to use olive by-products? *J Sci Food Agric*. 2020;100(3):915-25.
6. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(8):647-59.
7. Boskou D. Olive oil, Chemistry and Technology. Champaign, IL: AOCS Press; 1996.
8. Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Lou-Bonafonte JM, Martínez-Gracia MV, Osada J. Olive oil phenolic compounds as potential therapeutic agents. Vasallo N, editor. La Velella: Nova; 2008.
9. Ramírez-Torres A, Gabás C, Barranquero C, Martínez-Beamonte R, Fernández-Juan M, Navarro MA, et al. Squalene: Current Knowledge and Potential Therapeutic Uses. First edition ed. New York: NOVA; 2010.
10. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:141-7.
11. Sarria AJ, Surra JC, Acin S, Carnicer R, Navarro MA, Arbones-Mainar JM, et al. Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models. *Front Biosci*. 2006;11:955-67.
12. Demetrius L. Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO reports*. 2005;6:S39-S44.
13. Willett WC. Diet and health: what should we eat? *Science*. 1994;264:532-7.
14. Calleja L, Paris MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jimenez A, et al. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2368-75.
15. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Surra JC, Guzman MA, et al. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr Biochem*. 2007;18:418-24.
16. Guillen N, Acin S, Navarro MA, Perona JS, Arbones-Mainar JM, Arnal C, et al. Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis*. 2008;197:72-83.
17. Ramírez-Torres A, Barcelo-Batllori S, Martínez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, et al. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *J Proteomics*. 2012;77:27-39.
18. Ramírez-Torres A, Gabás-Rivera C, Osada J. Squalene: A Trove of Metabolic Actions. In: Boskou D, Clodoveo ML, editors. Products from Olive Tree: IntechOpen Limited; 2016.
19. Martínez-Beamonte R, Alda O, Sanclemente T, Felices MJ, Escusol S, Arnal C, et al. Hepatic subcellular distribution of squalene changes according to the experimental setting. *J Physiol Biochem*. 2018;74:531-8.
20. Herrera-Marcos LV, Sancho-Knapik S, Gabas-Rivera C, Barranquero C, Gascon S, Romanos E, et al. Pgc1a is responsible for the sex differences in hepatic Cidec/Fsp27beta mRNA expression in hepatic steatosis of mice fed a Western diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;318:E249-E61.
21. Gabas-Rivera C, Jurado-Ruiz E, Sanchez-Ortiz A, Romanos E, Martínez-Beamonte R, Navarro MA, et al. Dietary Squalene Induces Cytochromes Cyp2b10 and Cyp2c55 Independently of Sex, Dose, and Diet in Several Mouse Models. *Mol Nutr Food Res*. 2020;64:e2000354.

22. Nielsen J, Hedeholm RB, Heinemeier J, Bushnell PG, Christiansen JS, Olsen J, et al. Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*). *Science*. 2016;353:702-4.
23. WHO. 2021 Accesible: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/adjuvants/squalene/questions_and_answers/es/.
24. Arunachalam PS, Walls AC, Golden N, Atyeo C, Fischinger S, Li C, et al. Adjuvanting a subunit SARS-CoV-2 nanoparticle vaccine to induce protective immunity in non-human primates. *bioRxiv*. 2021:2021.02.10.430696.
25. Huang Z-R, Lin Y-K, Fang J-Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*. 2009;14:540-54.
26. Sharkallies. 2021 Accesible: <https://www.sharkallies.com/shark-free-products/squalene-adjuvants-in-vaccines>.
27. Biswas SM, Chakraborty N. Shedded *Artocarpus* leaves — Good plant sources of natural squalene with potent antioxidant and antimicrobial activity — Alternative to marine animals. *J Nat Pharm*. 2013;4:21-7.
28. Nham Tran TL, Miranda AF, Gupta A, Puri M, Ball AS, Adhikari B, et al. The Nutritional and Pharmacological Potential of New Australian *Thraustochytrids* Isolated from Mangrove Sediments. *Marine Drugs*. 2020;18:151.
29. Tateno M, Stone BJ, Srodulski SJ, Reedy S, Gawriluk TR, Chambers TM, et al. Synthetic Biology-derived triterpenes as efficacious immunomodulating adjuvants. *Scientific Reports*. 2020;10:17090.
30. Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56:1043-57.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos llevados a cabo por este grupo están financiados por el FEDER-AEI PID2019-104915RB-I00, grupo de referencia de investigación B16_20R del Gobierno de Aragón, Ciberobn y la Fundación Cuenca Villoro.

Si desea citar nuestro artículo:
**El escualeno, una molécula palpitante a pesar de los ciento
 cinco años de su descubrimiento**
 Jesús De la Osada García
 An Real Acad Farm [Internet].
 An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 2 (2021) · pp. 205- 211
 DOI: <http://>

